

Möglichkeiten der Differenzierung chondroider Tumore mittels Angiogenese und DNA-Zytometrie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Barbara Anna-Maria Peschka
aus Darmstadt

Gießen 2003

Möglichkeiten der Differenzierung chondroider Tumore mittels Angiogenese und DNA-Zytometrie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Barbara Anna-Maria Peschka

aus Darmstadt

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie
Institut für Pathologie
Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. med. Th. Dreyer
Gutachter: Prof. Dr. med. K. Preissner

Tag der Disputation: 24.06.2003

Für Oma Ruth

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	3
1.1	Allgemeine Einteilung von Knochentumoren	3
1.2	Aktueller Stand der Definition von chondromatösen Tumoren	5
1.2.1	Definition und Subklassifikation der Chondrome	6
1.2.2	Definition und Subklassifikation der Chondrosarkome	8
1.3	Problematik der Differenzierung von Chondromen und Chondrosarkomen	14
2.	FRAGESTELLUNG	18
3.	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Häufigkeitsverteilungen	22
3.1.1	Häufigkeitsverteilung der diagnostischen Gruppen	22
3.1.2	Geschlechtsverteilung	23
3.1.3	Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation	24
3.2	Material	25
3.3	Immunhistochemische Färbungen	26
3.4	Färbetechniken	26
3.4.1	HE-Färbung (Hämalaun-Eosin-Färbung)	26
3.4.2	LSAB-Färbung (Labeled Streptavidin Biotin-Färbung)	27
3.4.3	Feulgenfärbung	32
3.5	DNA-Messung	34
3.5.1	Gerätebeschreibung	34
3.5.2	Methode	34
3.6	Gefäßzählung	36
3.7	Statistische Methoden	38
4.	ERGEBNISSE	39
4.1	Vorversuch A	39

4.2	Vorversuch B	40
4.3	Einteilung der diagnostischen Gruppen	42
	a) Lokalisation	44
	b) Patientenalter	47
	c) Geschlechtsverteilung	48
	d) Gefäßversorgung	49
	e) Integrierte optische Dichte	53
	f) Kerngröße	59
4.4	Zusammenhang zwischen Tumorlokalisierung und	62
	a) Gefäßversorgung	62
	b) Integrierte optischen Dichte	64
	c) Kerngröße	66
4.5	Zusammenhang zwischen Gefäßversorgung und	67
	a) Integrierter optischen Dichte	67
	b) Kerngröße	69
5.	DISKUSSION	71
5.1	Gefäßversorgung	71
5.2	Integrierte optische Dichte und Kerngröße	75
5.3	Prognostische Bedeutung der Ergebnisse für einzelne Fälle	77
6.	ZUSAMMENFASSUNG	82
7.	ABKÜRZUNGSLEGENDE	85
8.	LITERATURVERZEICHNIS	86
9.	LEBENS LAUF	98
10.	DANKSAGUNG	100

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einteilung von Knochentumoren

Die ersten Untersuchungen zur Klassifikation von Knochentumoren gehen bereits in das erste Viertel des vergangenen Jahrhunderts zurück. Damals wurde bereits durch das Komitee des amerikanischen Knochengeschwulstregisters des American College of Surgeons, durch gesammelte Daten und Erfahrungen, eine Klassifikation der Knochentumore mit genauer Definition vorgelegt (KOTZ 1984, BLOODGOOD 1920, EWING 1922/28, CODMAN 1925, KOLODNY 1927).

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Einteilung von Tumoren hauptsächlich durch die Histogenese festgelegt und das biologische Verhalten weniger beachtet. Zum erstenmal wurde dem in der revidierten Klassifikation des amerikanischen Knochengeschwulstregisters (EWING 1939) Rechnung getragen. Man unterteilte nun auch in maligne und benigne Tumoren. Daraufhin folgte eine weitere Klassifikation, ausgelöst durch das Erkennen der verschiedenen Ursprungsorte der Tumore des "Knochengewebes".

Der von EWING (1922) geprägte Begriff des osteogenen Sarkoms für die, wie vermutet, vom Knochengewebe ausgehenden Tumoren wurde abgegrenzt und das Chondrosarkom (CHS) und das Fibrosarkom wurden definiert.

Die Gruppe der semimalignen Knochengeschwulste wurde in die Klassifikation aufgenommen. Damit war die Grundlage für die moderne Knochentumoreinteilung

nach histogenetischen Gesichtspunkten gelegt, welche später die Basis der Knochentumorklassifikation darstellte (Tab.1) (LICHTENSTEIN 1951).

Das dadurch beträchtlich erweiterte Wissen und die Vereinheitlichung der Terminologie durch SCHAJOWICZ, ACKERMANN und SISSONS (1972) wurden in einer von der WHO herausgegebenen Klassifikation umgesetzt.

Tab.1: WHO Klassifikation der Knochentumore

	BENIGNE	MALIGNE
1. Knochenbildende Tumore		
	Osteom	Osteosarkom
	Osteoidosteom	Juxtakortikales Osteosarkom
2. Knorpelbildende Tumore		
	Chondrom (CH.)	Chondrosarkom (CHS.)
	Osteochondrom	Juxtakortikales CHS.
	Chondroblastom	Mesenchymales CHS.
	Chondromyxoidfibrom	
3. Riesenzelltumore		
4. Knochenmarkstumore		
		Ewing-Sarkom
	-----	Retikulo-Sarkom d. Knochen
		Lympho-Sarkom d. Knochen
		Myelom
5. Vaskuläre Tumore		
	Hämangiom	Angiosarkom
	Lymphangiom	
	Glomustumor	
6. Andere Bindegewebstumore		
	Desmoplastisches Fibrom	Fibrosarkom
	Lipom	Liposarkom
		mal. Mesenchymom
		undiff. Sarkom
7. Andere Tumore		
	Chordom	
	Adamantinom d. langen Knochen	-----
	Schwanom	
	Neurofibrom	
8. Unklassifizierte Tumore		
9. Tumorähnliche Läsionen		

1.2 Aktueller Stand der Definition von chondromatösen Tumoren

Chondroide Tumore stellen zusammen mit den osteoiden Tumoren die häufigsten primären Skelettumoren in der Bevölkerung dar. Dabei bilden Chondrome mit 12% aller benignen Skelettumore den zweithäufigsten benignen und Chondrosarkome mit 10-20% der malignen Tumore den zweithäufigsten malignen primären Skelettumor (REMMLE 1997). In der WHO-Klassifikation von 1972 (Tabelle 1) werden die Tumore nach morphologischen, histogenetischen und biologischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt. Damit wurde eine große Genauigkeit und vor allem auch Reproduzierbarkeit in der Zuordnung dieser Tumore geschaffen. Es ist bei diesen Tumoren von großer Bedeutung, das klinisch-pathologische Bild bei der Beurteilung von Prognose und Klassifikation einer Geschwulst mit einzubeziehen. Der klinische Befund und Daten wie Röntgenbild, Tumorlokalisation, Altershäufigkeit, Geschlechtsverteilung, etc. geben damit wichtige Hinweise zur Klassifikation eines Tumors und dementsprechend auch zur Prognose und Therapie.

1.2.1 Definition und Subklassifikation der Chondrome

Das Chondrom ist ein lobulär strukturierter, benigner Tumor, der gleichmäßig differenzierte Chondrozyten enthält. Die Läppchenstrukturen werden von Osteoid und mineralisiertem Knochengewebe abgegrenzt (REMMLE 1997). Er zeichnet sich durch die Bildung reifen Knorpels aus, ohne dabei jedoch die histologischen Charakteristika des Chondrosarkoms aufzuweisen (FREYSCHMIDT 1998).

Die Lokalisation ist bevorzugt an den kurzen Röhrenknochen, wie Hand und Fuß (ca. 40%). Sie können jedoch auch an den langen Röhrenkochen oder am Stammskelett auftreten. In diesen Fällen kann die Abgrenzung vom Chondrosarkom I°, welches hier ebenfalls auftritt und nur durch subtile Analyse histologischer Kriterien abgegrenzt werden kann, problematisch sein (REMMLE 1997).

Während die Prognose des Chondroms des Handskeletts und des Periostes als günstig bezeichnet werden kann, werden die eher seltenen Chondrome der langen Röhrenknochen und des Stammes in ihrer Prognose als zweifelhaft bezeichnet.

Chondrome liegen in der Regel in der Metaphyse von Röhrenknochen, wobei man je nach Lage (zentral, exzentrisch und periostal) drei Typen unterscheiden kann (FREYSCHMIDT 1998).

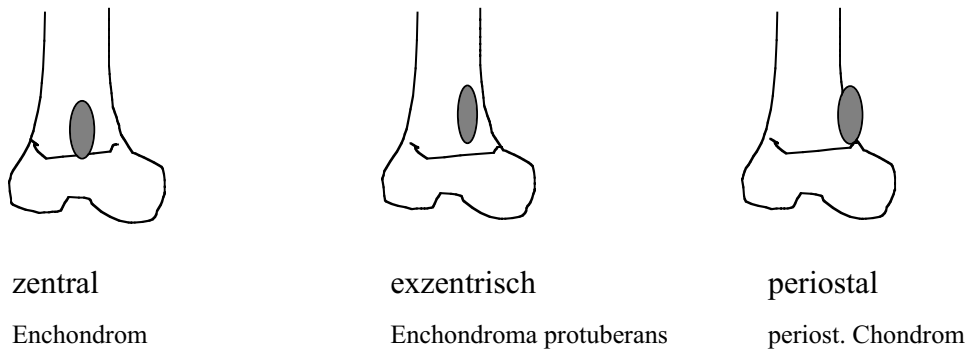


Abb.1: Lokalisation von Chondromen

Das solitäre Chondrom tritt zu 60% zwischen der 2. und 5. Lebensdekade auf. Eine Geschlechtsprädisposition gibt es nicht. Meist wird der Tumor zufällig entdeckt, da er aufgrund seines langsamen Wachstums oft keine klinischen Symptome auslöst. Unter Belastung kann es jedoch auch zu spontanen Frakturen kommen. Diese Tumoren neigen in der Regel nicht zu Rezidiven und nicht zur Metastasierung, obwohl in Einzelfällen maligne Entartungen beobachtet wurden. Dieses Risiko einer malignen Transformation ist bei Tumoren des Stammskeletts größer als bei peripher lokalisierten Tumoren (REMMLE 1997).

Röntgenologisch stellt sich der Tumor als scharf begrenzte Osteolyse dar, in welcher stippchenförmige Verkalkungen auftreten können. Die Differenzierung vom Knocheninfarkt ist jedoch durch konventionelle Röntgenaufnahmen nicht immer möglich. In diesem Fall sollte ein MRT zur Diagnosesicherung zusätzlich vorliegen (REMMLE 1997).

Makroskopisch besteht der Tumor aus hyalinem Knorpel,

der in ungefähr 10 mm große Läppchen gegliedert ist und eine grau glasige Farbe aufweist. Auch schleimige Umwandlungen sind möglich.

Histologisch findet man im Knorpelgewebe in läppchenförmigen Strukturen gleichmäßig geordnete Chondrozyten mit isomorphen Zellkernen. Kernatypien sind kaum anzutreffen. Zwischen den Läppchen lassen sich Bindegewebssepten mit wenigen Blutgefäßen ausmachen. Die Kortikalis in der Umgebung des Tumors kann bereits arrodiiert sein (REMMLE 1997).

Chondrome müssen bei Diagnosestellung grundsätzlich komplett entfernt werden, da es trotz ihrer primären Gutartigkeit zu einer malignen Entartung kommen kann. In den langen Röhrenknochen liegt diese Entartungshäufigkeit bei etwa 20-50%, am Hand- und Fußskelett kommt dieses wesentlich seltener vor. Therapie der Wahl ist die Kürettage über ein breites Knochenfenster (REMMLE 1997).

1.2.2 Definition und Subklassifikation der Chondrosarkome

Das Chondrosarkom, gekennzeichnet durch die Bildung chondroider Matrix, ist der zweithäufigste maligne Knochentumor. Von dem klassischen Chondrosarkom, welches in drei Malignitätsgrade differenziert werden kann, lassen sich Subtypen wie das dedifferenzierte-, das mesenchymale- und das Klarzell-Chondrosarkom abgrenzen (REMMLE 1997). Sie lassen sich vom Chondrom durch stärkeren Zellreichtum und Pleomorphie unter-

scheiden. Der Tumor kann sich direkt aus dem Knorpelgewebe entwickeln (=primäres Chondrosarkom) oder aus einem anderen, zunächst gutartigem Knorpeltumor entstehen (sekundäres Chondrosarkom). Letzteres entsteht vorwiegend bei jüngeren Patienten (RIEDE 2001).

Tab.2: Klassifikation der Chondrosarkome (CHS) nach SCHAJOWICZ (1981)

Primäres Chondrosarkom:	
<ul style="list-style-type: none"> • Zentrales CHS (I-III°) • Juxtakortikales (periostales) CHS (I-III°) • Mesenchymales CHS • Dedifferenziertes CHS (histol.Grad IV) • Klarzell CHS. 	
Sekundäres Chondrosarkom:	
• Zentrales CHS.	Chondrom(Enchondrom) Multiple Enchondrome
• Peripheres CHS.	Solitäres Osteochondrom Multiple Osteochondromatose Periostales Chondrom

Die Hauptlokalisation betrifft zu 58% das Stammskelett und zu 22% die stammnahen Extremitäten. Die Tumoren des Stammskeletts liegen zu 50% im Becken, die der Extremitäten verteilen sich nahezu gleichmäßig auf Schulter- und Beckengürtel. Seltener anzutreffen sind die stammfernen Lokalisationen wie Hand- und Fußskelett, wobei diese prognostisch als günstiger bewertet werden können (REMMLE 1997).

Die dem Stammskelett nahe gelegenen Tumoren haben eine schlechte Prognose und auch eine ungünstigere Ausgangssituation aufgrund des ausgedehnten lokal

destruierenden Wachstums und der schwerwiegenden Folgen einer radikalen Resektion (Extremitätenverlust) (SCHUMPELICK 2000).

Das klassische Chondrosarkom kann man, wie das Chondrom, aufgrund seiner Lage in drei Typen unterteilen. Man unterscheidet auch hier das zentral gelegene von dem exzentrischen und dem periostalen Chondrosarkom, wobei die Erstgenannten den Hauptanteil ausmachen (FREYSCHMIDT 1998).

Das Chondrosarkom hat zwei Altersgipfel (5. und 7. Lebensdekade). 62% der Patienten sind älter als 50 Jahre. Die Geschlechtsverteilung Männer:Frauen beträgt 3:2 (REMMLE 1997).

Die Symptome sind aufgrund des langsamen Wachstums meist unspezifisch. Das Metastasierungspotential ist sehr niedrig (FLETSCHER 2000). Bevorzugtes Organ zur Tumorabsiedlung ist die Lunge. Der Tumor kann in Gefäße einbrechen und lange intravasale Tumorzapfen bilden. Es kommt erst sehr spät zu hämatogenen und fast nie zu lymphogenen Metastasen. Bei unvollständiger Resektion neigt das Chondrosarkom, wie andere Malignome auch, zu lokalen Rezidiven und bei Biopsieentnahme zu Implantationsmetastasen im Biopsiekanal (RIEDE 2001).

Der radiologische Befund hängt von der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors ab. Bei langsamem Fortschreiten kommt es zur Auftreibung des befallenen Abschnittes (Periostreaktion), wohingegen es bei schnellem Wachstum zur Destruktion der Skelettregion

kommt. Im Tumor befinden sich oft stippchenförmige oder flächige Verkalkungen.

Makroskopisch imponiert das Chondrosarkom als ein läppchen- und knotenförmig aufgebauter derber Tumor mit grau glasiger Schnittfläche, auf welcher sich Nekrosen und Blutungen zeigen. Die Kortikalis kann durch den im Markraum wachsenden Tumor und dessen Infiltrationen durch reaktive Knochenbildung entweder verdickt oder durch Destruktion verdünnt sein. Bedingt durch das langsame Wachstum werden diese Tumoren meist erst bei einer beträchtlichen Größe diagnostiziert. Eine Aussage über den genauen Ausgangspunkt des Tumors lässt sich dann nur noch schwer treffen. Das Chondrosarkom breitet sich exzentrisch aus und umwächst die Spongiosa, was sich im histologischen Schnitt durch scheinbar isolierte Trabekel zeigt (REMMLE 1997).

Entscheidend für die Prognose ist die histologische Subklassifikation des klassischen oder zentralen Chondrosarkoms. Diese Differenzierung lässt sich aufgrund der Kerngröße, -struktur sowie -polymorphie treffen und kann den Tumor in drei verschiedene Malignitätsgrade einteilen. Am häufigsten kommt das Chondrosarkom I° vor (48%), welches auch als hochdifferenziert beschrieben wird und kleine pyknotische Zellkerne ohne Kernpolymorphien aufweist. Die Differenzierung zum Chondrom ist oft problematisch.

Das Chondrosarkom II° tritt mit 45% auch häufig auf, weist im Gegensatz zum hochdifferenzierten Chondrosarkom jedoch eine höhere Zelldichte und auch

größere Zellkerne auf. Kernpolymorphien treten bereits in geringem Umfang auf. Die früher oft zitierten Doppelkernformen stellen alleine kein zuverlässiges Merkmal zur Differentialdiagnose Chondrom versus Chondrosarkom bzw. zur Differenzierung I-III° dar (REMMLE 1997).

Das wenig differenzierte Chondrosarkom III° ist selten und weist eindeutige Kernpolymorphien und eine hohe Zelldichte auf. Es zeigt eine aufgelockerte Chromatinstruktur. Der Mitoseindex wird nicht zur Einteilung des Differenzierungsgrades herangezogen, da die Proliferationsaktivität (Zahl der Mitosen) bei Chondrosarkomen hierfür zu niedrig ist (KOTZ 1984).

Außer dem klassischen Chondrosarkom gibt es Sonderformen. Hierzu zählen (REMMLE 1997):

- das dedifferenzierte Chondrosarkom, bei dem hochdifferenzierte Knorpelkomponenten neben niedrigen, zellreichen Anteilen auftreten, die auch aus anderen Sarkomdifferenzierungen (Osteosarkom, Fibrosarkom, malignes fibröses Histiozytom) bestehen können. Ihre Prognose ist ungünstig, da diese Tumoren zu Rezidiven und zur Metastasierung neigen.
- das mesenchymale Chondrosarkom, welches überwiegend aus einer zellreichen, kleinzelligen undifferenzierten Komponente besteht und Einschlüsse hochdifferenzierter chondroider Areale aufweist. Es hat ebenfalls eine sehr ungünstige Prognose.
- das Klarzell-Chondrosarkom, welches sehr selten ist, langsam wächst und eine gute Prognose hat. Der Prädispositionsort für diesen Tumortyp ist die

proximale Femurregion. Es besteht aus großen hellen Zellen, chondroiden Arealen und fibrös strukturierten Knochentrabekelneubildungen.

Die Problematik in der Therapie der Chondrosarkome liegt in erster Linie in der lokalen Tumorkontrolle, da diese Tumoren zu lokalen Rezidiven neigen. Es ist eine radikale Resektion notwendig, die bei großen Tumoren oder ungünstigen Lokalisationen oft schwer durchführbar ist, bzw. zu einem Extremitätenverlust führt. Wenn eine Resektion nach onkologischen Kriterien nicht radikal durchgeführt werden kann, besteht ein hohes lokales Rezidivrisiko (REMMLE 1997).

Eine Studie der Mayo Clinic hat ergeben, dass die 5-Jahres-Überlebensrate beim Chondrosarkom 77% beträgt. Das Metastasierungsrisiko für Chondrosarkome I° beträgt 4%, das für Tumoren mit höherem Malignitätsgrad 30%, wobei jedoch berücksichtigt werden muss, dass der Hauptteil der Tumoren hochdifferenziert ist, also dem Chondrosarkome I° entspricht. Daraus geht hervor, dass sich die Prognose des Tumors mit dem Abnehmen des Differenzierungsgrades verschlechtert (FLETSCHER 2000). Chondrosarkome mit einer geringeren Größe (<4 cm) sind prognostisch günstiger als größere Tumoren. Dies gilt auch für peripher gelegene und aus Exostosen entstandenen Chondrosarkome (KOTZ 1984). Es stellt sich keine Korrelation zwischen Tumorgöße und Metastasierungsrisiko dar. Die trotzdem prognostisch ungünstigere Einschätzung großer Tumoren hängt mit den begrenzten lokalen Therapiemöglichkeiten und den

damit verbundenen Rezidiven zusammen (SCHUMPELICK 2000).

1.3 Problematik der Differenzierung von Chondromen und Chondrosarkomen

Trotz der inzwischen erarbeiteten detaillierten Malignitätskriterien, kann es gelegentlich problematisch sein, zwischen dem hochdifferenzierten Chondrosarkom I° und dem Chondrom zu unterscheiden.

In Einzelfällen sind Aussagen nur nach DNA-Analysen oder durch den Nachweis des invasiven Wachstums möglich. MURPHEY (1998) beschreibt eine 90%ige Genauigkeit in der Unterscheidung von Chondromen und Chondrosarkomen, die stamfern lokalisiert sind, aufgrund von Kortikalisdestruktion, periostealer Reaktion und weiteren radiologischen Kriterien.

Chondrome und Chondrosarkome I° haben eine sehr geringe Zelldichte und selten Doppelkerne oder mehrkernige Riesenzellen. Erst bei Chondrosarkomen höherer Malignitätsgrade ist eine eindeutige Abgrenzung vom Chondrom möglich, da Kerndichte und Polymorphie hier zunehmen.

Die Bedeutung der Abgrenzung des Chondroms vom Chondrosarkom liegt in der unterschiedlichen Therapie der beiden Tumoren. Da Chondrosarkome auf Chemotherapie wegen der geringen Proliferationsrate üblicherweise nicht ansprechen und auch nicht strahlensensibel sind, ist die Therapie der Wahl die operative Entfernung. Die vollständige Resektion

ist sowohl bei Chondrosarkomen als auch bei Chondromen wichtig, um lokale Rezidive zu vermeiden. Beim Chondrom ist eine Kürettage über ein breites Knochenfenster über die gesamte Länge des Tumors ausreichend (REMMLE 1997). Bei Chondrosarkomen ist die radikale Resektion von größter Wichtigkeit. Die Fehlinterpretation eines Chondrosarkoms als Chondrom hat somit eine unzureichende Behandlung und damit ein hohes Rezidivrisiko zur Folge. Andererseits würde das Verkennen eines Chondroms als Chondrosarkom eine Übertherapie bedeuten.

Ein Merkmal, welches der Diagnosestellung von malignen Tumoren verschiedensten Charakters dient und einen wichtigen Prognosefaktor darstellt, ist die Angiogenese.

Bei der Angiogenese handelt es sich um den Prozess der Bildung neuer kapillärer Gefäße, was zum einen physiologische Ursachen haben kann, wie z.B. die Wundheilung, zum anderen jedoch auch pathologischen Ursachen zu Grunde liegen kann, wie dieses z.B. bei der diabetischen Retinopathie oder dem Tumorwachstum auftritt (FOLKMAN 1991).

Tumore können sich bis zu einer gewissen Größe durch Diffusion von Nährstoffen aus der Umgebung ernähren. Nach dem Überschreiten eines bestimmten Ausmaßes werden jedoch tumoreigene Gefäße zum weiteren Wachstum, und zur Ausbildung von Metastasen, benötigt.

Auf der Suche nach der Ursache der Angiogenese und dem damit verbundenen Tumorstadium, und vor allem nach einer Möglichkeit diese zu unterdrücken, wurden verschiedene Faktoren beschrieben, welche die Angiogenese beeinflussen.

Zunächst beschrieb SHING (1980) den basic fibroblast growth factor (bFGF) und es folgte der vascular endothelial growth factor (VEGF), der von FERRARA (1997/99) erstmals beschrieben wurde. Es handelt sich hier um zwei Stimulatoren der Angiogenese.

Des Weiteren wurden Inhibitoren der Angiogenese, wie z.B. Angiostatin und Endostatin, beschrieben (O'REILLY 1994/97).

Das Ausmaß bzw. Auftreten der Angiogenese hängt von dem Gleich- bzw. Ungleichgewicht der Inhibitoren und Stimulatoren ab (HANAHAN 1996). Ein Überwiegen der Angiogenese-Stimulatoren, wie z.B. dem VEGF, führt in den Tumoren zu dem sogenannten „angiogenic-switch“. Dieses bedeutet die Ausbildung neuer kapillärer Gefäße (Angiogenese), die zu einem Wachstum der Tumore und zur Ausbildung von Metastasen führen können (FOLKMAN 2002).

Eine Unterdrückung der Angiogenese, durch die Zufuhr von Inhibitoren oder die Hemmung der Stimulatoren der Angiogenese, würde den „Stillstand“ des Tumorstadiums bedeuten. Dieses ist für die Therapie maligner Tumoren von großer Bedeutung, da es eine Verstärkung der bereits bestehenden konventionellen Therapieverfahren, wie Chemotherapie und Strahlen-

therapie, darstellen könnte (FOLKMAN 1999, BOEHM 1997).

In einer Studie von HOLZER (2001) wurde bei Patienten mit Chondrosarkomen, ebenso wie beim Auftreten von Osteosarkomen und Ewing-Sarkomen, eine Erhöhung des VEGF im Serum gegenüber der Kontrolle gesunder Probanden beschrieben. Es handelt sich hierbei wie oben beschrieben um einen Stimulator der Angiogenese.

Aus diesem Grund wurde in dieser Studie die Angiogenese bei Chondromen und Chondrosarkomen durch immunhistochemische Färbungen überprüft, um einen weiteren Parameter zur besseren Differenzierung der Tumore zu erhalten.

2. FRAGESTELLUNG

Ziel dieser Untersuchung war es, anhand von histologischen, immunhistochemischen und zytometrischen Merkmalen chondroide Tumore neu zu klassifizieren und mit klinischen Daten zu korrelieren. Hierbei wurde überprüft, ob es möglich sei, anhand dieser neuen Parameter eine genauere Klassifikation der Tumore vornehmen zu können.

Speziell bei der Differenzierung von Chondromen versus Chondrosarkomen I° wäre dies ein Fortschritt, da hier das histologische Bild dieser Entitäten sehr ähnlich sein kann. Die hohe Rezidivrate stammskelett-naher Chondrome im Vergleich zu weiter peripher gelegenen Chondromen lässt Zweifel an der jeweils korrekten histologischen Zuordnung aufkommen und legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den stammnahen Chondromen im Einzelfall um Chondrosarkome gehandelt haben könnte.

Ausgehend von den Ergebnissen vieler Studien weiß man, dass das Tumorwachstum und das Metastasierungsrisiko auch von der Gefäßneubildung in den Tumoren abhängt. Maligne Tumore haben die Fähigkeit, Faktoren zu bilden, die eine Angiogenese induzieren (GIL 1993). Sie zeigen daher auch histologisch eine Gefäßneubildung.

Bei ausreichender Gefäßversorgung der Tumorzellen werden Wachstum und Metastasierung begünstigt (FOLKMAN 1991).

Weiterhin ist das Metastasierungspotential bei fehlender Gefäßversorgung des Tumors aufgehoben oder vermindert, da die Verbreitung von Tumorzellen über den Kreislauf nicht stattfinden kann (EIJAN 1991).

Ein weiterer wesentlicher Indikator in der Tumorforschung sind die Zellkernmerkmale in bezug auf die Tumordifferenzierung. Chondrosarkome zeigen eine positive Korrelation mit dem Grad der Aneuploidie (diploid, tetraploid, aneuploid) und der Häufigkeit Rezidive zu bilden (HELIO 1995). Die Überlebensrate von Patienten mit aneuploiden Tumoren ist im Gegensatz zu Patienten mit diploiden Tumoren wesentlich herabgesetzt (ADLER 1995).

Zwei Fragen standen also hier im Vordergrund:

1. Lassen sich Chondrosarkome und Chondrome anhand tumorbedingter Angiogenese unterscheiden?
2. Welchen Beitrag leisten DNA-Gehalt und Kerngröße für die Unterscheidung hochdifferenzierter Chondrosarkome versus Chondrome?

3. MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Studie wurde das bioptisch-chirurgische Untersuchungsmaterial der Chondrome und Chondrosarkome des Zentrums für Pathologie der JLU Gießen aus den Jahren 1983-1995 reklassifiziert. Die Grundlagen hierfür waren klinische Daten wie Patientenalter und -geschlecht, Tumorlokalisation, das Auftreten eines Rezidivs und die Morphologie der Tumoren. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Untersuchung die Merkmale:

- Gefäßverteilung im Tumor
- Gefäßgröße
- Gefäßlokalisation
- DNA-Gehalt der Tumorzellen (=integrierte optische Dichte)
- Kerngröße in Tumorzellen

mittels immunhistochemischer Färbungen und DNA-Analysen getestet.

Das Untersuchungsmaterial bestand aus allen in der Zeit von 1983 bis 1995 in das Knochentumorregister aufgenommenen Chondrosarkomen (CHS). Dies entsprach insgesamt 31 CHS. Davon waren drei CHS III°, neun CHS II° und 19 CHS I°, dazu kamen sechs Rezidive. Außerdem ein Teil der in diesem Zeitraum aufgetretenen Chondrome (CH) (insgesamt 20, dazu kam 1 Rezidiv).

Die Chondrosarkome, deren Malignitätsgrad nicht genau angegeben war, wurden wie folgt reklassifiziert:

Chondrosarkome I-II° --> II° (3 Fälle)

Chondrosarkome II-III° --> III° (2 Fälle)

Tab.3: Bearbeitete Fälle der Studie:

	Nr.	KT.-Nr.	m/w	Pat.-Alter	Tumorlokalisation
CHS III°	1	48/86	m	18	Kl. Becken
	2	127/87	w	58	Thoraxwand, Rez. 26/88
	3	113/94	m	39	HWS 5, intraspinal, extradural
CHS II°	4	158/94	m	70	6.Rippe re.
	5	44/86	w	32	Rippe li., CH prim., Rez. 9/93+153/94 CHS II°
	6	144/49	m	32	1.Rippe re., Lungenmetastase 100/94
	7	66/86	w	58	Prox. Tibia re., Hautmetastase 158/93
	8	49/86	w	65	Dist. Femur, Rez. 181/91
	9	2/85	w	36	Kiefer(Rez.), Erstdiagn.: '83, Ameloblastom
	10	98/93	m	66	Kehlkopf
	11	72/94	m	42	Rippe
	12	72/90	w	54	Os ileum
CHS I°	13	110/94	m	81	Femurschaft
	14	182/93	m	63	Rippe
	15	125/93	w	51	Dist. Tibiametaphyse
	16	43/83	m	53	Humeruskopf, Rez. 66/93
	17	24/93	m	28	BWS 2/3
	18	14/93	w	62	Prox. Humerusmetaphyse li.
	19	17/92	w	43	Trochanter
	20	180/91	w	54	Humeruskopf
	21	170/91	w	44	Dist. Femur
	22	?/78	m	34	4.Rippe, CH prim., Rez. 111/91 CHS I°
	23	36/90	m	39	Becken
	24	? /73	m	33	Becken, Rez. 32/86
	25	6/86	m	62	Becken
	26	164/85	w	37	Humeruskopf
	27	3/85	m	43	Femur
	28	76/84	m	39	Dist. Femur
	29	19/84	w	43	Becken
	30	4/83	w	44	Ileosacralgelenk
	31	23/92	w	62	Prox Femur

CH	32	108/86	m	44	Humeruskopf, prim. CHS I°, Rez. 16/89 CH
	33	20/89	w	33	Prox. Phalanx
	34	157/89	m	58	Dist. Femurmetaphyse
	35	162/89	m	17	Grundphalanxköpfchen
	36	11/90	w	38	4.Grundphalanx
	37	41/90	m	43	4.Grundphalanx
	38	143/90	w	20	Ulna
	39	95/91	m	18	Cricoid
	40	18/92	m	8	5.Grundphalanx
	41	85/92	w	43	Femurschaft
	42	99/92	w	43	Femur
	43	121/92	w	43	5.prox Phalanx
	44	146/92	m	56	Femur
	45	51/93	m	61	Dist. Femur
	46	94/93	m	18	5.Grundphalanx
	47	119/93	m	17	Prox. Femurdiaphyse
	48	128/93	w	48	Dist. Femur
	49	130/93	m	30	5.Zehe
	50	62/94	w	42	4.Grundphalanx
	51	185/94	m	20	2.Phalanx

3.1 Häufigkeitsverteilungen

3.1.1 Häufigkeitsverteilung der diagnostischen Gruppen

Von insgesamt 51 Fällen waren 39,2%(20 Fälle) den Chondromen zuzuordnen und 37,3%(19 Fälle) den Chondrosarkomen I°. Der Rest setzte sich aus höhergradigen Chondrosarkomen II° und III° zusammen 23,5%(12 Fälle). Von allen Tumoren, die in der Studie aufgeführt wurden, hatten 13,7%(7 Fälle) ein Rezidiv.

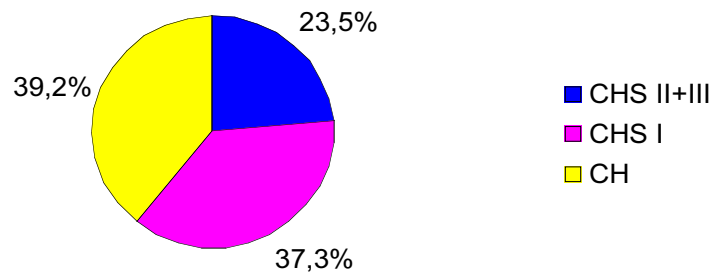


Abb.2: Häufigkeit der untersuchten Gruppen

3.1.2 Geschlechtsverteilung

Bei den 51 in die Studie aufgenommenen Fällen handelte es sich in 54,9% (28 Fälle) um männliche (m) Patienten und in 45,1% (23 Fälle) um weibliche (w) Patienten. Bei den Chondrosarkomen II+III° bestand ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Die Chondrosarkome I° lagen zu 47,4% (9 Fälle) bei weiblichen und zu 52,6% (10 Fälle) bei männlichen Patienten vor. Bei den Chondromen war das Verhältnis weiblich/männlich 2 zu 3, d.h. 40% (8 Fälle) der weiblichen und 60% (12 Fälle) der männlichen Patienten waren betroffen.

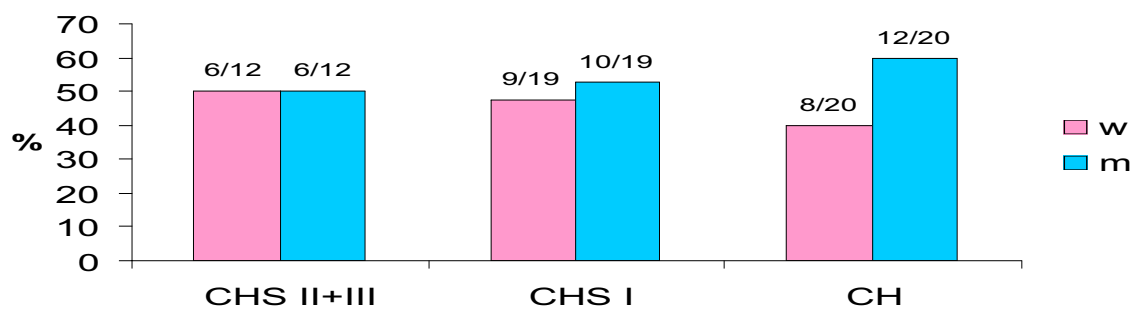


Abb.3: Geschlechtsverteilung der Chondrome und Chondrosarkome

3.1.3 Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation

	CHS	CH	CH+CHS	CHS %	CH%	CH+CHS%
Becken	7	0	7	22,6	0	13,73
Thorax, Sternum, BWS	8	0	8	25,8	0	15,69
Kopf	1	0	1	3,2	0	1,96
HWS, Cricoid	2	1	3	6,45	5	5,88
Humerus	4	1	5	12,9	5	9,8
Ulna, Radius	0	1	1	0	5	1,96
Hand	0	9	9	0	45	17,65
Femur	7	7	14	22,6	35	27,45
Tibia, Fibula	2	0	2	6,45	0	3,92
Fuß	0	1	1	0	5	1,96

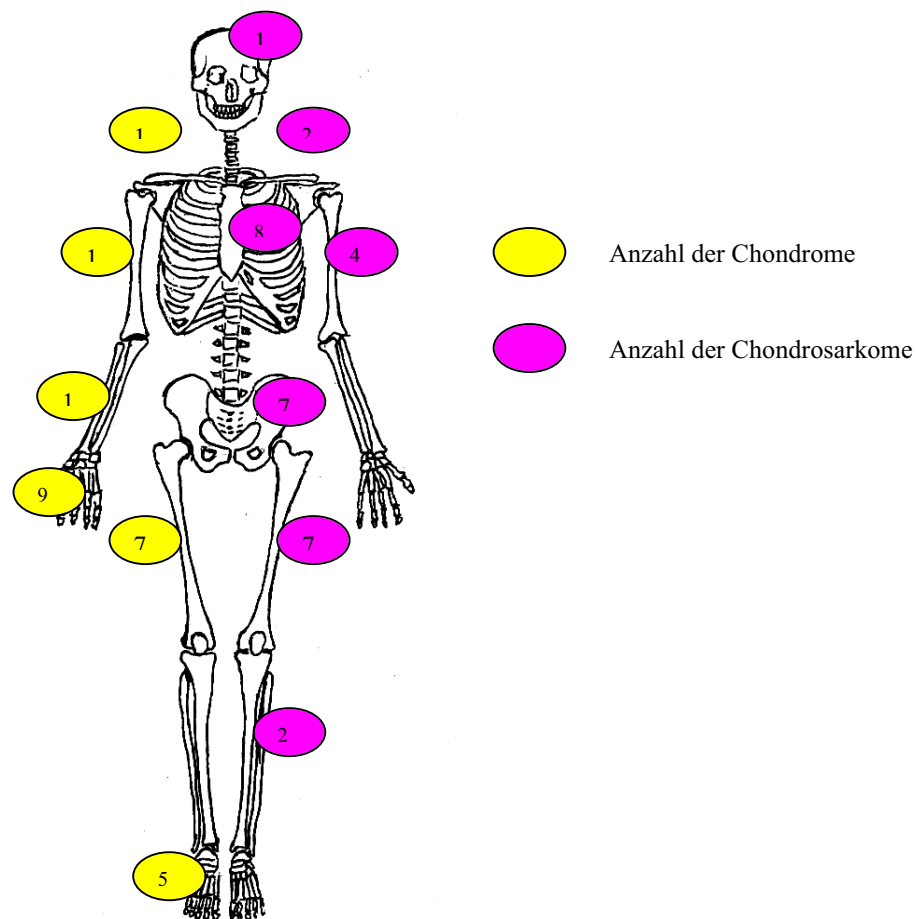


Abb.4: Ganzkörperskelett. Darstellung der Häufigkeitsverteilungen der Chondrosarkome und Chondrome in Zusammenhang mit der Lokalisationsverteilung.

3.2 Material

Zunächst wurden die klinischen Daten der Patienten mit Chondromen und Chondrosarkomen aus den Krankenunterlagen entnommen. Für das Patientengut konnten im Einzelnen, wie oben bereits erwähnt, folgende Daten ermittelt werden:

- Lokalisation des Primärtumors
- Alters- und Geschlechtsverteilung
- Malignitätsgrad
- Auftreten von Rezidiven oder Metastasen

Anschließend wurden von den ausgewählten Fällen Schnittpräparate in einer Stärke von 3-4 µm angefertigt und diese histochemisch und immunhistochemisch gefärbt.

Da es sich um eine retrospektive Studie handelt und teilweise nur sehr geringe Mengen an Material zur Untersuchung vorlagen, musste auf das Anfertigen von seriellen Schnitten, die eine bessere Beurteilung der Gefäßversorgung erlaubt hätten, verzichtet werden. Es wurde von jedem vorhandenen Paraffinblock eines Tumors ein Schnitt pro Färbemethode angefertigt (zwischen 1-4 Paraffinblöcke pro Tumor).

Die Präparate konnten dann nach Kriterien wie dem Vorhandensein von Tumorgewebe, Gefäßversorgung und Malignitätsgrad ausgewertet werden.

Ausgewählt wurden alle Chondrosarkome des Registers (hier wurden die Schnitte ausgewählt, auf deren Paraffinblöcken ausreichend Tumorgewebe zur Dar-

stellung kam) und ein Teil der Chondrome. Da hier genügend Fälle vorhanden waren, wurden 20 Chondrome zufällig ausgewählt.

3.3 Immunhistochemische Färbungen

Es wurde einerseits die übliche Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Zur objektiven und quantitativen Erfassung von kleinen kapillären Gefäßen mit nur schmalen Gefäßwänden (der Vaskularisation) sowie zur Darstellung von chondroiden Differenzierungen (aufgrund der Unreife des Knorpels in der HE-Histologie nicht zweifelsfrei erkennbar) wurden zusätzlich weitere Spezialfärbungen angefertigt. Dazu zählen die Feulgenfärbung und die immunhistochemischen Färbungen in der Labeled Streptavidin Biotin-Technik (LSAB-Technik) mit folgenden Antikörpern:

- CD 34 (Endothel-Marker)
- von Willebrand Faktor (=vWF) (Endothel-Marker)
- S 100 (Tumor-Marker)

3.4 Färbetechniken

3.4.1 HE-Färbung (Hämalaun-Eosin-Färbung)

Die HE-Färbetechnik ist die mit am häufigsten angewandte Färbemethode. Hierbei werden die basophilen

Anteile des Gewebes und der Zelle (z.B. Chromatin der Zellkerne, Teile der Knorpelgrundsubstanz) blau und die azidophilen Bestandteile (z.B. Interzellularsubstanz, Cytoplasma) rot angefärbt (SCHIEBLER 2001).

Färbeschritte:

1. Objektträger mit Präparat zum Entparaffinieren in Xylol für 10 min.
2. Absteigende Alkoholreihe:
 - 100% für 3 min.
 - 96% eintauchen *
 - 70% eintauchen *
3. In Aqua dest. eintauchen *
4. Hämalaun für 7 min.
5. Normales Leitungswasser für 10 min.
6. Eosin für 4 min.
7. Aufsteigende Alkoholreihe:
 - 2 mal 70%, je 3-5 mal eintauchen
 - 2 mal 96%, je 3-5 mal eintauchen
 - 2 mal 100%, je 3-5 mal eintauchen
8. Abschließend in Xylol, bis zum Eindeckeln mit Diatex, aufbewahren

*bis keine Schlieren mehr zu sehen sind.

3.4.2 LSAB-Färbung (Labeled Streptavidin Biotin-Färbung)

Bei der LSAB-Färbung handelt es sich um eine indirekte Methode der Markierung eines Primäranti-

körpers, die sich auf die hohe Bindungskraft zwischen den Glycoprotein Avidin und Biotin zurückführen läßt. Dies wurde von GUESDON (1979) entdeckt. Streptavidin ist ein Protein welches aus 4 Untereinheiten besteht, die jeweils eine Bindung mit Biotin eingehen können (TRUE 1990). Man benötigt für diese Technik einen biotinylierten Brückenantikörper der sich an den Primärantikörper setzt und mit Peroxidase markiertes Streptavidin, welches sich wiederum an das Biotin bindet. Neben dieser Technik (LSAB = markierte Streptavidin Biotin Technik) gibt es noch die ABC-Technik (Avidin-Biotin-Complex), auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll (BOENISCH 1983). GIORNO (1984) beschreibt eine 4-8 mal höhere Empfindlichkeit von LSAB gegenüber der ABC-Technik. Die starke Affinität von Biotin und Avidin sowie der chemisch milde Biotinylierungsprozess haben dieser Technik im Vergleich zu anderen direkten und indirekten Techniken eine höhere Sensitivität verliehen.

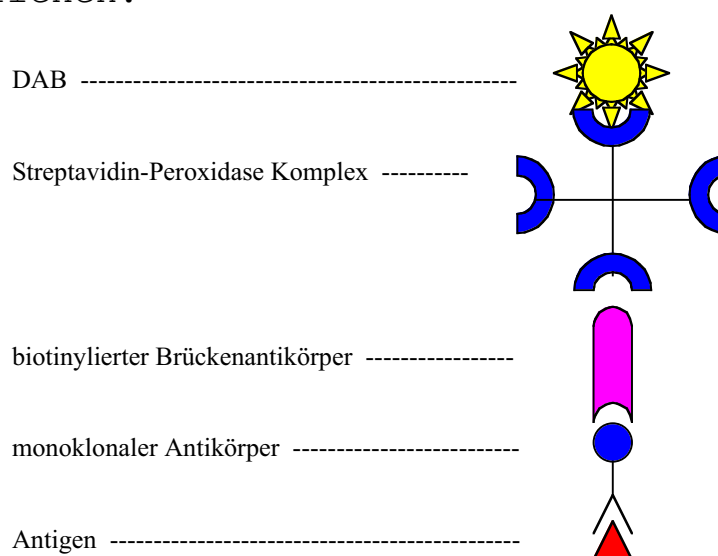


Abb.5: LSAB-Färbetechnik

Materialien und Färbeschritte

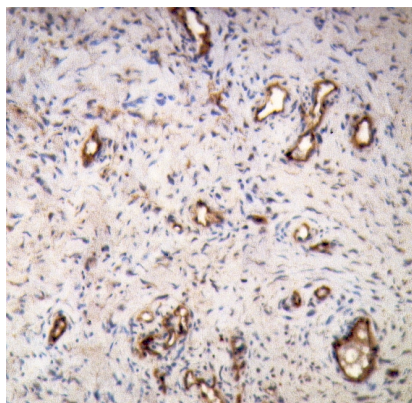
1. Entparaffinisierung der Schnitte:
 - Xylol (10 min.)
 - Azeton (10 min.)
 - Azeton-Waschpuffer (10 min.)
 - 1x spülen in reinem Tris-Waschpuffer.
2. Danach kommen die Präparate, je nach Individualität des Antikörpers, zur Trypsinierung für 30 min. in den Wärmofen (keine Mikrowelle, da die Schnitte hier zu leicht abschwimmen). Präparate zur Färbung mit CD 34 brauchen nicht in den Wärmofen.
3. Zur Blockade der endogenen Peroxidase (Konditionierung) werden sie nun mit 10% Wasserstoffperoxid in Methan behandelt.
4. Nun folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der mit RPMI oder 2%iger BSA Lösung auf seine Endkonzentration gebracht wird, für 30 min.
5. Die mit S 100 inkubierten Präparate werden nun zusätzlich für 30 min. mit einem Brückenantikörper in einer Verdünnung von 1:300 mit Tris-Waschpuffer behandelt.
6. Inkubation mit dem biotinyliertem Brückenantikörper (DAKO) für 30 min. in einer Verdünnung von 1:200 mit Tris-Waschpuffer.
7. Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (DAKO) für 30 min. in einer Verdünnung von 1:250 mit Tris-Waschpuffer.
8. Inkubation für 4-8 min. mit DAB-Chromogen (DAKO) und anschließend spülen in Leitungswasser.

9. Der letzte Schritt ist die Gegenfärbung in Hämalaun, wonach die Präparate wieder in Leitungswasser gespült werden.

Bei den Schritten 2 bis 7 müssen die Schnitte jeweils im Anschluss an die Inkubationszeit 3 mal in Tris-Waschpuffer gespült werden.

Verwendete Antikörper:

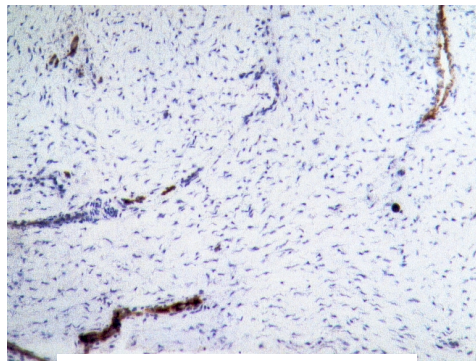
1. CD 34 (dianova, Hamburg)=Endothelmarker, monoklonal Maus, Isotyp: IgG1 (Maus), Verdünnung: 1:50 mit BSA (Albuminfraktion V aus Rinderserum, 2% in Tris-Puffer). CD 34 ist in vielen Studien über Gefäßendothelien verwendet worden und stellte sich, wie auch hier, als gut geeigneter Marker heraus, der dem vWF überlegen ist.



Fall Nr.2, CHS III°, CD 34

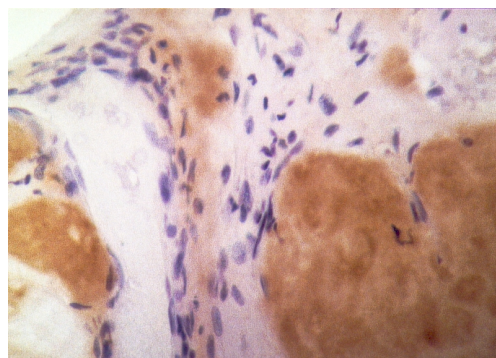
2. Von Willebrand Faktor (vWF) (DAKO)=Endothelmarker, monoklonal Maus, Isotyp: IgG1 (Maus), Verdünnung: 1:50 mit BSA.

Er reagiert in endothelialen Zellen in dem er den von Willebrand-Teil des Faktor VIII erkennt. Er kann aber auch im Cytoplasma von Megakaryozyten in bestimmten Knochenmarksabschnitten nachgewiesen werden.



Fall Nr.1, CHSIII°, vWF

3. S 100 (DAKO)=Tumormarker, Kaninchen-Anti-Rind, Verdünnung: 1:2000 mit BSA. Der Antikörper S 100 wurde an verschiedenen menschlichen Geweben ausgetestet und ist streng S 100 spezifisch. Er färbt verschiedene neurogene Strukturen, verschiedene Hautzellen, benigne und maligne melanozytäre Tumore und außerdem Knochentumoren an. Der Tumormarker dient der Differenzierung von Tumoren und deren Ursprungsgewebe.



Fall Nr.7, CHS II°, S 100

Herstellung von Tris-Waschpuffer (für 5 Liter):

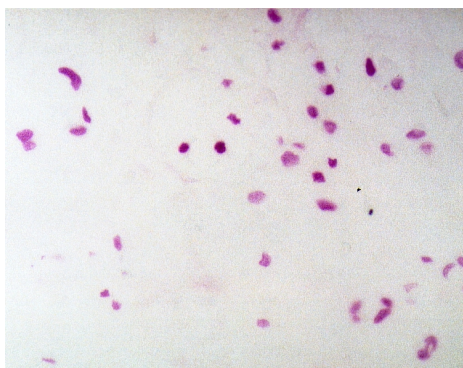
- Tris-Base 4,5 g
- Tris HCl 34,25 g
- NaCl 43,9 g
- Aqua dest. 0,625 l

⇒ Der Ansatz muss auf die Endkonzentration hochverdünnt werden.

3.4.3 Feulgenfärbung

Eine zusätzlich durchgeführte Feulgenfärbung wurde zur quantitativen Bestimmung der nukleären DNA-Menge, die über die integrierte optische Dichte der Schnittpräparate (IOD_s) bestimmt werden konnte, genutzt. Zusätzlich konnte eine Bestimmung der Kerngröße erfolgen.

Die Feulgen Färbung dient der Darstellung der DNA und ist die spezifischste Methode um Chromatin darzustellen. Sie wurde 1924 von FEULGEN und ROSSENBECK zum ersten Mal beschrieben. Sie beruht auf Hydrolyse der Purindesoxyribose-Verbindung der DNA durch Schiff'sches Reagenz und führt zu einer purpurroten Färbung der DNA.



Fall Nr.2, CHS III°, Rezidiv, Feulgen

Färbeschritte der automatischen Feulgenfärbung:

Position	Dauer(min.)	Inhalt
2	20	Xylol bzw. Xylolersatz=Histoclear
3	5	100%iger Alkohol
4	5	96%iger Alkohol
5	50	Mischfix
6	5	70%iger Alkohol
7	2	Aqua dest.
8	55	4 NHCl, 28°C
9	5	Leitungswasser(Durchflusssküvette)
10	2	Aqua dest.
11*	60	Schiff`sches Reagenz
12*	10	SO ₂ -Wasser
13*	10	SO ₂ -Wasser
14*	10	SO ₂ -Wasser
15	5	Leitungswasser(Durchflusssküvette)
16	2	Aqua dest.
17	5	70%iger Alkohol
18	5	96%iger Alkohol
19	5	100%iger Alkohol
20	10	Xylol bzw. Xylolersatz

*Küvetten mit geringem Volumen verwenden.

Gerät: Shandon Varistain 24-F (Shandon, Frankfurt/Main),
nach BÖCKING (1986).

Nach Ablauf der Färbung können die Präparate 1-2 Tage in Xylol verbleiben, bevor sie eingedeckelt werden. Außerdem sind die Präparate lichtgeschützt aufzubewahren (Ausbleichung!).

3.5 DNA-Messung

3.5.1 Gerätebeschreibung

Das Messungssystem bestand aus einem, von einem PC-gesteuerten, Bildprozessor (IBAS der Firma Kontron, Deutschland) mit Standard-Software (IBAS 2.0) und einer 3CCD Kamera (DXC-3000P Sony, Japan), die an ein Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Deutschland) angeschlossen war.

Alle Messungen wurden mit einer 63 x Objektivvergrößerung (Zeiss Plan-Neofluar 63x/1.25 Öl) durchgeführt. Die Bilder wurden über den Grün Kanal der Kamera aquiriert (Wellenlängeninterwall: 490-575 nm).

3.5.2 Methode

Zur besseren visuellen Darstellung, insbesondere unreifer Knorpelabschnitte, wurde eine S 100 Färbung verwendet. Die tumorösen Anteile kamen durch den Antikörper angefärbt zur Darstellung. Dann wurden diese Areale auf den korrespondierenden, Feulgen gefärbten Schnitten aufgesucht und markiert. Aus diesen markierten Arealen, meist von mehreren Schnitten zu einem Fall zugehörig, wurden dann pro Fall ca. 300 Zellkerne ausgesucht, bearbeitet und schließlich über das oben beschriebene Computerprogramm ausgewertet. Dabei wurden die Präparate

bei einer Objektivvergrößerung von 63x (mit Öl) bearbeitet. Die verwertbaren Zellkerne wurden segmentiert und so für den Computer als Messobjekt kennbar gemacht. Sich überschneidende Zellkerne wurden nicht in die Messung aufgenommen, und pro Messfeld wurden nicht mehr als zehn Zellkerne ausgewertet. So konnte von jedem Fall die durchschnittliche Kernfläche, die integrierte optische Dichte (IOD_s) sowie deren Mittelwert und Standardabweichung bestimmt werden. Zusätzlich wurde der Anteil der hypertetraploiden Zellen bestimmt, die 5c exceeding rate (5cER). Die 5cER wurde definiert als der Prozentsatz an Zellen deren DNA-Gehalt über 5c lag (BOECKING 1984).

Die Berechnung der 2c-Werte erfolgte anhand des Mittelwertes der integrierten optischen Dichte (MIOD_s) der euploiden Chondrome mit normalem DNA-Gehalt. Hier zeigte sich eine Standardabweichung von 1,54 und ein Mittelwert von 3,61.

$$\begin{aligned}\text{Variationskoeffizient} &= \text{Standardabweichung/Mittelwert} \\ &= 1,54/3,61 \\ &= 0,43\end{aligned}$$

Bei der Auswertung der DNA-Histogramme wurden die einzelnen Fälle nach der AUER-Klassifikation bewertet. AUER(1980) unterteilt die DNA-Verteilungshistogramme in vier verschiedene Typen:

- Typ I: Einzelner DNA-Peak in der diploiden Region der normalen Zellen, nur einzelne Zellen weichen von diesem Peak um einige Prozent ab.
- Typ II: Hier zeigt sich ein zusätzlicher Peak oder eine Erhebung in der tetraploiden Region (zwei Peaks in der 2c und 4c Region). Diese beiden Peaks korrespondieren entweder miteinander durch einige wenige Zellen oder haben keine Verbindung.
- Typ III: Er unterscheidet sich vom Typ II nur dadurch, dass eine beträchtliche Anzahl von Zellen mit DNA-Gehalt, ähnlich dem normaler Zellen, vorhanden ist. Zwischen den Peaks zeigen sich ebenfalls Zellen.
- Typ IV: Hier zeigt sich eine sehr unregelmäßige aneuploide Zellansammlung von 2c bis hin zu 6c oder 8c.

Bei euploiden Zellen handelt es sich um Zellen mit normalem DNA-Gehalt, welche auch zu den von AUER definierten Typen I-III zählen können. Lediglich bei den AUER IV-Histogrammen muss es sich um aneuploide Zellansammlungen handeln.

3.6 Gefäßzählung

Hier wurde die Gefäßlokalisation und die Gefäßgröße bzw. der Gefäßtyp mit dem Malignitätsgrad der

Tumore korreliert. Es wurde untersucht, wie nahe die Gefäße an den Tumor heranreichen und inwieweit im Tumor selbst Gefäße vorhanden sind.

Bei der Auswertung der Gefäßversorgung der Tumore wurden die Präparate, welche mit dem Endothelmarker CD 34 (Gefäßdarstellung) immunhistochemisch gefärbt wurden, beurteilt. Dabei wurde, wie oben bereits erwähnt, über die S 100 Färbung ermittelt, wo sich tumoröse Anteile darstellen. Diese wurden dann markiert. So konnte man einerseits eine Aussage über die Gefäßgröße und Gefäßanzahl und andererseits über die Gefäßlokalisation in bezug auf den Tumor treffen. Es wurden bei jedem Tumor die tumorösen Areale mit der höchsten Dichte an Gefäßen aufgesucht und ausgewertet.

Ein Verfahren zur Bewertung der Angiogenese in Tumoren verschiedensten Charakters ist die Chalkley counting-Technik (FOX 1995, VERMEULEN 1996), die auf einer Auszählung der Gefäße in den Areale mit der höchsten Gefäßdichte (hot spots) des Tumors beruht.

Da es sich in dieser Studie um einen rein explorativen Ansatz handelte, und zunächst überhaupt das Auftreten von Angiogenese in den primär avasculären Tumoren untersucht werden sollte, wurde diese Methode nicht verwandt, sondern lediglich das Vorhandensein der Gefäße, deren Lagebeziehung zum Tumor und deren Charakter (kapillär/kavernös) ausgewertet.

(Siehe hierzu -> 4.2 Vorversuch B)

3.7 Statistische Methoden

Zur Darstellung der gewonnenen Daten wurden zunächst Histogramme erstellt um Zusammenhänge erkennen zu können. Anschließend wurde zur Auswertung der Daten der Chi-Quadrat-Test angewandt. Hierzu wurden die nichtmetrischen Merkmale der Tumore, wie Tumorlokalisation, Patientengeschlecht, Diagnosegruppe und Gefäßlokalisation durch Zahlen verschlüsselt (= Nominaldaten). Bei den metrischen Merkmalen der Tumore (Patientenalter, Integrierte optische Dichte und Kernfläche) wurde durch die Bildung von Klassen ebenfalls Gruppierungsmerkmale, wie bei den nichtmetrischen Merkmalen, gewonnen (siehe Tabelle 4a, b und c).

Zusätzlich wurden die metrischen Merkmale durch Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vorversuch A

In einem Vorversuch wurde das Ansprechen der verschiedenen Färbemethoden und verschiedene Antikörper getestet. Dazu wurden aus jeder diagnostischen Gruppe zwei Fälle zufällig ausgewählt und von ihnen 3-4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und gefärbt.

-2 Chondrome

-2 Chondrosarkome I°

-2 Chondrosarkome II-III°

Als Färbemethoden wurden benutzt:

1. Hämalaun-Eosin-Färbung

2. Immunhistochemische Färbung in LSAB-Technik mit folgenden Antikörpern:

-CD 34 (Endothel-Marker)

-vWF (Endothel-Marker)

-S 100 (Tumor-Marker)

3. Feulgen Färbung

Ziel dieses Vorversuches war es herauszufinden, ob die verschiedenen Antikörper eine ausreichende Darstellung der Gefäße und der tumorösen Areale auf den Präparaten zeigten, und in welchem Ausmaß Artefakte auftraten.

Es zeigte sich ein gutes Ansprechen aller Färbemethoden. Die mit dem Antikörper CD 34 gefärbten Schnitte lieferten jedoch eine bessere Darstellung

der Gefäße als die mit vWF behandelten Präparate, bei welchen sich häufiger Artefakte zeigten. Die S 100-Färbung, sowie die Feulgen- und HE-Färbung zeigten in allen drei diagnostischen Gruppen eine gute Reaktion, die ebenso wie die CD 34 Färbung zu gut auswertbaren Ergebnissen führten. Die vWF-Färbung wurde aufgrund der ihr überlegenen CD 34-Färbung nicht weiter verwendet.

4.2 Vorversuch B

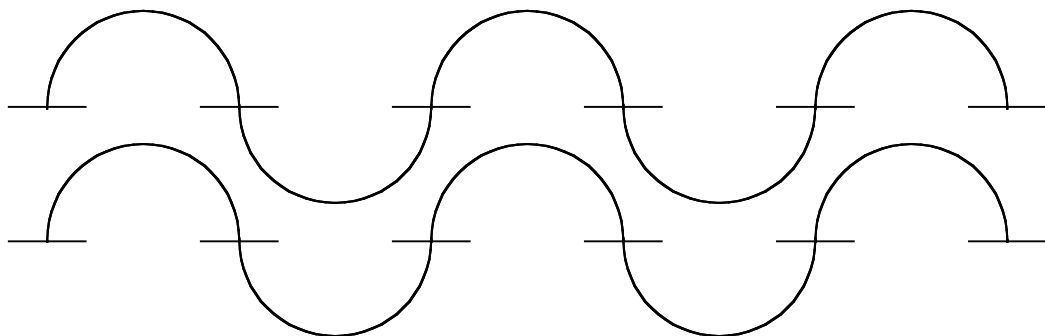
In einem zweiten Vorversuch wurde die Methode zur Auswertung der Gefäßversorgung der Tumore ermittelt.

Hierzu wurden aus jeder diagnostischen Gruppe fünf Fälle ausgewählt und anschließend wie folgt begutachtet:

Zunächst wurde mit einem Mikroskop, welchem ein Raster vor dem Okular vorgeschaltet war, gearbeitet. Es wurden dann in einem Gesichtsfeld drei verschiedene Größen gemessen:

1. Punktzahl der Rasterpunkte, die im Gewebe liegen, zur Bestimmung des Querschnittes.
2. Anzahl der Linien, die eine Gefäßwand kreuzen.
3. Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld (Gefäßdichte).

Abb.6:
Raster



Auf diese Weise sollte eine Aussage über den durchschnittlichen Kaliberdurchmesser der Gefäße und die Anzahl der Gefäße getroffen werden.

Beim Durchmustern der Präparate zeigte sich, dass es nicht auf die Anzahl der Gefäße im bindegewebigen Stützgerüst des Tumors ankam, sondern auf die Lage und den Charakter der Gefäße. Dabei konnte eine Differenzierung zwischen kavernösen und kapillären Gefäßen und zwischen der Gefäßlokalisation innerhalb und außerhalb der chondromatösen Tumoranteile mit dieser Methode nicht erfolgen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass kavernöse Gefäße aufgrund ihres großen Durchmessers mehrfach angeschnitten und somit möglicherweise auch mehrfach gezählt wurden. Da es sich hierbei prinzipiell um wichtige Merkmale zur Bewertung des Tumorcharakters handelt, diese aber mit der Rasteruntersuchung nicht objektivierbar waren, musste diese Methode als Versuchsansatz verworfen werden.

Im weiteren Verlauf wurde die Bewertung der Gefäßversorgung der Präparate durch immer den gleichen Begutachter beschrieben und ausgewertet, wobei dieser während der Bewertung keine Kenntnis über das vorher definierte Tumorstadium hatte.

Zur Auswertung wurden, wenn Gefäße vorhanden waren, immer die Areale mit der höchsten Gefäßdichte (hot spots) herangezogen.

4.3 Einteilung der diagnostischen Gruppen

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Tumore in vier Gruppen unterteilt:

1. Chondrome (20 Fälle)
2. Chondrosarkome I° (19 Fälle)
3. Chondrosarkome II+III° (12 Fälle)
4. Chondrosarkom- und Chondromrezidive (7 Fälle)

Die Chondrosarkome II+III° wurden aufgrund ihrer geringen Anzahl in einer Gruppe geführt.

Im nun Folgenden wurden die verschiedenen Parameter gegeneinander aufgetragen und statistisch ausgewertet. Die Ausprägungen der einzelnen Merkmale wurden hierbei klassifiziert in 2, 3 oder 4 Klassen und dann ausgewertet (siehe Tab.4a). Dabei wurden verschiedene Merkmalsklassen bezüglich ihrer Abhängigkeiten untereinander und auf Korrelation überprüft. Das Signifikanzniveau wurde durch den Chi-Quadrat-Test ermittelt (siehe Tab.4b+c).

Tab.4a: Ausprägungen der einzelnen Merkmale, Klassifikationsmatrix I

		Diagnosegruppe				Tumorklassifikation			Geschlechtsgruppe		Gefäßlokalisation		Gefäßgröße			Altersgruppe				Integrierte opt. Dichte			
		1	2	3	4	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4
Tumorklassifikation	1	10	0	0	0	x	x	x															
	2	10	11	5	3	x	x	x															
	3	0	8	7	4	x	x	x															
Geschlechtsgruppe	1	8	9	6	3	4	14	5	x	x													
	2	12	10	6	4	6	12	10	x	x													
Gefäßlokalisation	1	16	6	0	1	8	11	3	9	13	x	x											
	2	4	13	12	6	2	15	12	14	15	x	x											
Gefäßgröße	1	12	4	0	1	6	8	2	7	9	16	0	x	x	x								
	2	5	1	2	1	1	6	1	3	5	4	4	x	x	x								
	3	3	14	10	5	3	12	12	13	14	2	25	x	x	x								
Altersgruppe	1	7	0	1	0	4	3	1	1	7	6	2	4	2	2	x	x	x	x				
	2	3	6	4	1	3	4	6	5	8	5	8	3	1	9	x	x	x	x				
	3	9	8	4	4	3	13	5	14	7	10	11	8	3	10	x	x	x	x				
	4	1	5	3	2	0	6	3	3	6	1	8	1	2	6	x	x	x	x				
Integr. opt. Dichte	1	9	7	2	0	4	11	3	10	8	12	6	9	3	6	2	2	12	2	x	x	x	x
	2	3	6	2	4	1	5	5	4	7	3	8	2	3	6	2	4	2	3	x	x	x	x
	3	5	0	5	0	4	5	1	6	4	3	7	2	1	7	2	4	2	2	x	x	x	x
	4	0	1	1	1	0	0	2	1	1	0	2	0	0	2	0	0	1	1	x	x	x	x
Kernfläche	1	10	9	3	0	4	14	4	12	10	11	11	8	5	9	2	4	12	4	15	5	2	0
	2	7	4	5	2	5	6	5	7	9	7	9	5	2	9	4	5	3	4	2	6	7	1
	3	0	1	1	2	0	1	1	2	0	0	2	0	0	2	0	1	1	0	0	0	1	1
	4	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Diagnosegruppe	1 = CH, 2 = CHS I°, 3 = CHS II+III°, 4 = Rezidive																						
Tumorklassifikation	1 = stammfern, 2 = stammnah, 3 = Stamm																						
Geschlechtsgruppe	1 = weiblich, 2 = männlich																						
Gefäßlokalisation	1 = keine Gefäße im Knorpel, 2 = Gefäße im Knorpel																						
Gefäßgröße	1 =keine Gefäße, 2 = kavernöse Gefäße, 3 = kapilläre Gefäße																						
Altersgruppe	1 = 0-20 Jahre, 2 = 21-40 Jahre, 3 = 41-60 Jahre, 4 = 61-81 Jahre																						
Integrierte opt. Dichte	1 = 1.3 - 5.0; 2 = 5.01 -8.7; 3 = 8.71 - 12.4; 4 = 12.41 - 16.1 (MIOD)																						
Kernfläche (µm²)	1 = 8.8 - 15.3; 2 = 15.31 - 21.8; 3 = 21.81 - 28.3; 4 = 28.31 - 34.8 (MNA)																						

Tab.4b+c: Korrelation der einzelnen Merkmale mittels Chi-Quadrat-Test, Klassifikationsmatrix II

CHI-Quadrat-Wert	Diagnosegruppe	Tumorkalisation	Geschlechtsgruppe	Gefäßlokalisation	Gefäßgröße	Altersgruppe	Integr.opt.Dichte	Kernfläche
Diagnosegruppe	X							
Tumorkalisation	23,648	X						
Geschlechtsgruppe	0,379	1,747	X					
Gefäßlokalisation	23,89	8,821	0,274	X				
Gefäßgröße	16,629	8,361	0,299	35,297	X			
Altersgruppe	15,955	9,679	8,113	7,362	4,977	X		
Integr.opt.Dichte	20,191	10,664	1,417	7,373	6,549	11,261	X	
Kernfläche	15,592	5,707	3,409	2,68	3,696	7,834	23,769	X

p-Wert	Diagnosegruppe	Tumorkalisation	Geschlechtsgruppe	Gefäßlokalisation	Gefäßgröße	Altersgruppe	Integr.opt.Dichte	Kernfläche
Diagnosegruppe	X							
Tumorkalisation	0,0006	X						
Geschlechtsgruppe	0,945	0,417	X					
Gefäßlokalisation	$2,63 \times 10^{-5}$	0,012	0,601	X				
Gefäßgröße	0,011	0,079	0,861	$2,16 \times 10^{-8}$	X			
Altersgruppe	0,068	0,139	0,044	0,061	0,547	X		
integr.opt.Dichte	0,016	0,099	0,702	0,061	0,365	0,258	X	
Kernfläche	0,076	0,457	0,333	0,444	0,718	0,551	0,005	X

p=Probabilität mit der die 0-Hypothese angenommen wird

hochsignifikant=<0,01

signifikant=<0,05

a) Lokalisation

Wie oben schon erwähnt, trat der Hauptteil der Chondrome stammfern auf, wohingegen die Chondrosarkome eher stammnah lokalisiert waren. Da die Prognose des Tumors um so schlechter wird, je näher

er am Stamm lokalisiert ist, wurde in drei Lokalisationsbereiche unterteilt:

1. Stamm (Scapula, BWS, LWS, Becken, Rippen, Sternum, Clavicula)
2. stammnah (Femur, Tibia, Fibula, Humerus, Radius, Ulna, HWS, Cricoid, Gesichtsschädel)
3. stammfern (Hand- und Fußskelett)

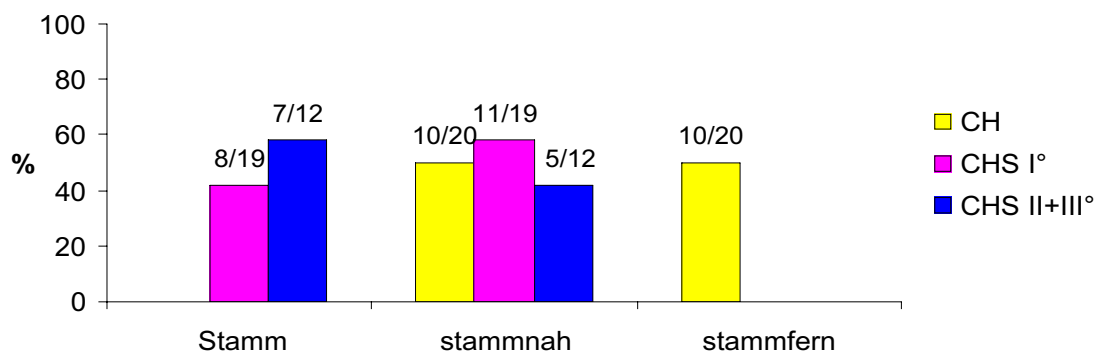


Abb.7: Lokalisation in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation.

Es waren 58,3% der hochgradigen malignen Chondrosarkome am Stamm lokalisiert, der Rest (41,7%) lag stammnah. Bei den Chondrosarkomen I° waren 42,1% am Stamm lokalisiert und 57,9% lagen stammnah.

In beiden Gruppen der Chondrosarkome trat eine stammferne Lokalisation nicht auf. Es zeigte sich außerdem, dass der größere Anteil der niedrig malignen Chondrosarkome I° nicht am Stamm lokalisiert war, sondern lediglich stammnah lag, im Gegensatz zu den Chondrosarkomen II+III°.

Die Chondrome dagegen lagen zur Hälfte stammfern und

zur anderen Hälfte stammnah. Sie waren im Gegensatz zu den Chondrosarkomen, innerhalb der stammnahen Lokalisation eher distal gelegen, so z.B. an der Ulna. Lokalisationen am Stamm traten bei Chondromen nicht auf. Das einzige Rezidiv, welches in der Gruppe der Chondrome auftrat, war, wie die Rezidive der Chondrosarkome ebenfalls, sehr stammnah lokalisiert (Humeruskopf). Bei den Chondrosarkomen waren vier der insgesamt sechs Rezidive am Stamm lokalisiert, zwei lagen stammnah (distaler Femur, Humeruskopf).

Mittels Chi-Quadrat-Test konnten zwischen Tumorlokalisation und der Diagnosegruppe hochsignifikante Zusammenhänge dargestellt werden ($p=0,006$; Tab. 4b+c).

Stammnah kamen alle drei Gruppen vor, wobei die Chondrosarkome jedoch klar überwogen. Die am Stamm lokalisierten Tumore waren ausschließlich Chondrosarkome und die stammfern gelegenen Tumore ausschließlich Chondrome.

b) Patientenalter

Chondrome treten hauptsächlich zwischen der 2. und 5. Lebensdekade auf während Chondrosarkome größtenteils jenseits der 5. Lebensdekade diagnostiziert werden. Man kann zwei Altersgipfel in der 5. und 7. Lebensdekade beobachten (REMMLE 1997).

Es konnte zwischen Patientenalter und Malignitätsgrad des Tumors keine Abhängigkeit gezeigt werden. Im Chi-Quadrat-Test zeigte sich weder hier noch zwischen den anderen Merkmalsausprägungen, die mit dem Tumor in Zusammenhang stehen, und dem Patientenalter ein signifikanter Zusammenhang.

Die Hauptzahl der Chondrome trat in der zweiten (6 Fälle) bzw. in der fünften (7 Fälle) Lebensdekade auf. Die Chondrosarkome hingegen hatten eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen der dritten und siebenten Dekade.

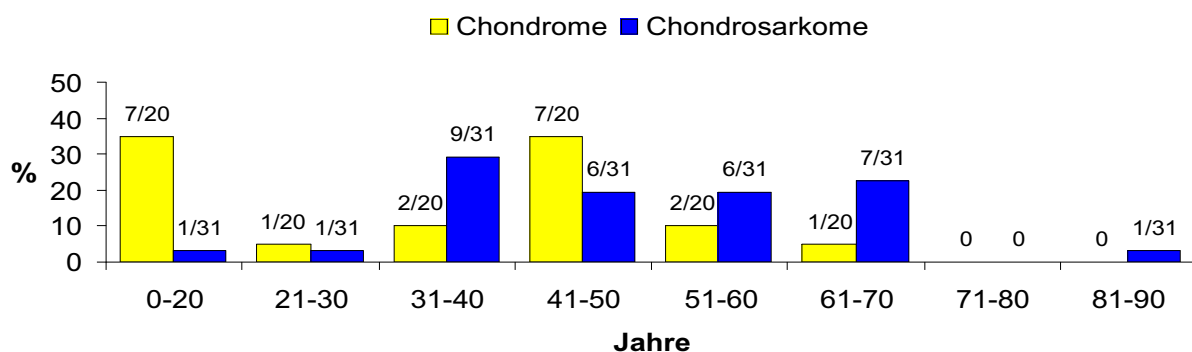


Abb.9: Altersverteilung in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation

c) Geschlechtsverteilung

Nach Literaturangaben sind Chondrome bei Frauen und Männern gleich häufig. Chondrosarkome treten mit einer Prädominanz von 3:2 etwas häufiger bei Männern auf (FREYSCHMIDT 1998).

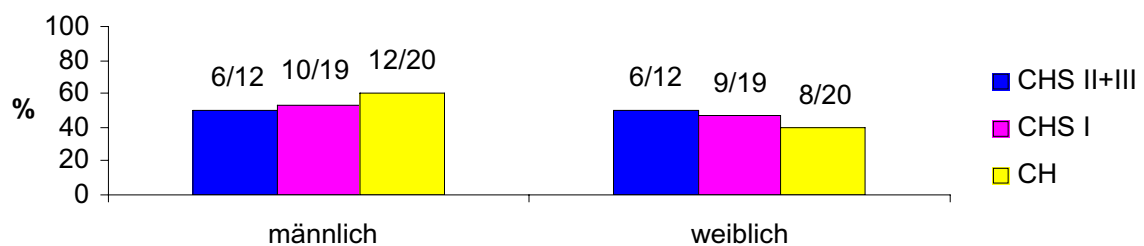


Abb.10: Geschlechtsverteilung der Chondrome + Chondrosarkome

Es zeigte sich in dieser Studie eine ausgeglichene Geschlechtsverteilung der Tumore. Das Verhältnis m/w bei den Chondrosarkomen betrug bei 31 Fällen 16/15 und bei den Chondromen bei 20 Fällen 12/8. Auch bei den Rezidiven zeigte sich dies. Von den sechs Rezidiven der Chondrosarkome war die Verteilung m/w gleich 3/3. Das Chondromrezidiv war bei einem männlichen Patienten aufgetreten.

Dies bestätigt sich auch in der Korrelationsüberprüfung mittels Chi-Quadrat-Test. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der Geschlechtsverteilung mit den anderen Merkmalsausprägungen.

d) Gefäßversorgung

Gefäßlokalisation:

Bei allen hochmalignen Chondrosarkomen traten die Gefäße direkt im tumorösen Knorpelanteil auf. Zu 68,4% war dies auch bei den Chondrosarkomen I° der Fall. Hier hatten 31,6% der Fälle keine Gefäßversorgung direkt im Knorpel. Dies sind 6 von 19 Fällen, von denen jedoch 2 Fälle Gefäße in direkter Verbindung zum Knorpel aufwiesen. Weitere drei der sechs Fälle konnten aufgrund des geringen Materials nicht ausreichend begutachtet werden.

Die Chondrome hatten zum überwiegenden Anteil (80%) keine Gefäße im Knorpel oder in unmittelbarer Umgebung. In 4 Fällen traf dies jedoch nicht zu. Bei zwei von den vier Fällen war der Tumor am Femur lokalisiert und die Patienten befanden sich in der fünften (w) bzw. sechsten (m) Lebensdekade. Die anderen beiden Fälle waren stammfern lokalisiert (Digitus).

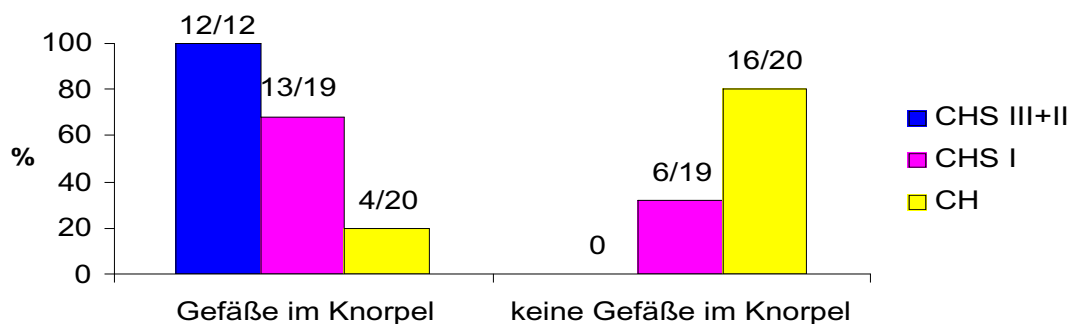


Abb.11: Gefäßlokalisation in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation.

Bei der Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test zeigten sich hochsignifikante Ergebnisse zwischen der Gefäßlokalisation und der Diagnosegruppe ($p=2,63 \times 10^{-5}$). Ebenfalls ein hochsignifikantes Ergebnis erzielte die Gefäßlokalisation in Zusammenhang mit der Tumorlokalisation ($p=0,012$) und der Gefäßgröße ($p=2,16 \times 10^{-8}$).

Gefäßgröße:

Bei der Auswertung der Gefäßgröße ist es wichtig zu unterscheiden, ob es sich um kapilläre (Angiogenese) oder um kavernöse Gefäße handelt, welche vereinzelt auftreten, aber nicht in Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen.

Es wurde untersucht, ob Gefäße im Tumor vorhanden waren und wenn dies der Fall war, ob es sich hierbei um kapilläre oder kavernöse Gefäße handelte.

Anders als bei der Auswertung bezüglich des Gefäßvorkommens im Tumor werden bei der Auswertung des Gefäßcharakters auch die Gefäße mit klassifiziert, die sich in unmittelbarer Nähe des Tumors befanden. Entsprechend ändern sich die absoluten Zahlenwerte.

Dies wird in der weiteren Beschreibung der Ergebnisse jeweils so fortgeführt (siehe 4.4 a und 4.5 a/b)

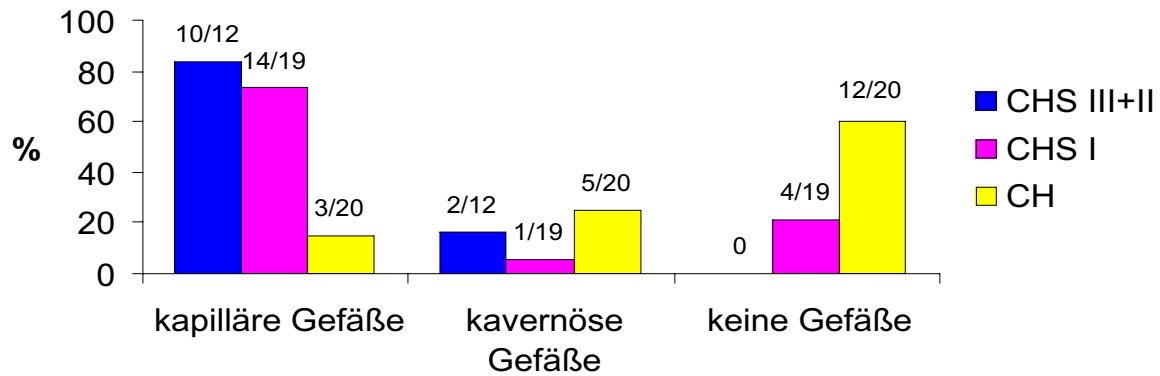


Abb.12: Gefäßcharakter in Abhängigkeit von der Tumor-
klassifikation

Alle hochgradigen malignen Chondrosarkome und auch die Mehrzahl der Chondrosarkome I° enthielten Gefäße in den tumorösen Anteilen des Präparates. Dabei handelte es sich hauptsächlich um kapilläre Gefäße, als Ausdruck der Angiogenese. Zwei Fälle der Chondrosarkome II+III° hatten kavernöse Gefäße in den Präparaten. Dabei handelte es sich einmal um ein CHS II°, welches am distalen Femur lokalisiert war, und bei dem nach 5 Jahren ein Rezidiv auftrat, wo eine Angiogenese nachgewiesen werden konnte. Der zweite Fall wurde ebenfalls als CHS II° klassifiziert und war am Os ileum lokalisiert.

Bei den Chondrosarkomen I° gab es vier Fälle, bei denen keine Gefäße in tumorösen Arealen gefunden werden konnten. Ein CHS I° wies lediglich kavernöse Gefäße in unmittelbarer Umgebung zum Tumor auf. Die Rezidive der Chondrosarkome wiesen alle sechs eine Gefäßversorgung in den tumorösen Arealen auf. In fünf Fällen durch kapilläre, in einem Fall durch kavernöse Gefäße.

Im Gegensatz dazu hatten 85% der Chondrome entweder keine oder nur kavernöse Gefäße (25%) im Tumorgewebe. 15% der Chondrome zeigten kapilläre Gefäße im Knorpel. In Abbildung 13 ist der Zusammenhang zwischen Gefäßcharakter und Malignitätsgrad dargestellt.

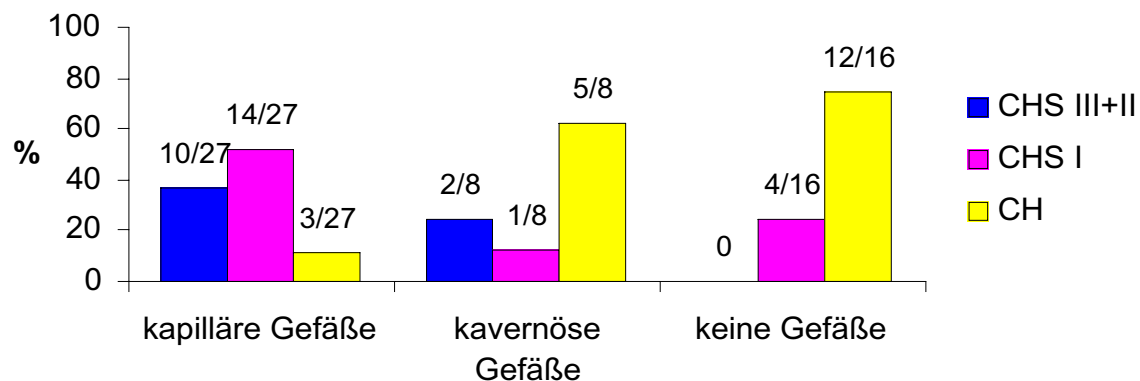


Abb.13: Gefäßcharakter. 88,9% aller Tumore, welche kapilläre Gefäße aufwiesen waren Chondrosarkome. Im Gegensatz dazu zählten 75% der Tumore ohne Gefäße zu den Chondromen. Bei den kavernösen Gefäßen handelte es sich nur um 8 Fälle insgesamt, was das Ergebnis etwas relativiert.

Im Chi-Quadrat-Test konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang der Gefäßgröße mit der Diagnosegruppe gezeigt werden ($p=0,011$). Ebenfalls eine hohe Signifikanz zeigte sich, wie oben schon erwähnt, zwischen Gefäßgröße und Gefäßlokalisation ($p=2,16 \times 10^{-8}$). Die anderen Merkmalsausprägungen korrelierten nicht signifikant mit der Gefäßgröße.

e) Integrierte optische Dichte

Bei der Messung der integrierten optischen Dichte konnten aufgrund von teilweise nicht ausreichendem Material nicht alle Fälle in die Auswertung mit einbezogen werden, so dass hier eine geringere Anzahl der Tumoren ausgewertet wurde. Es handelt sich um 10 Chondrosarkome II+III°, 14 Chondrosarkome I°, 17 Chondrome und 5 Chondrosarkomrezidive.

Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurde ein IOD_s-Index erstellt. Er berechnet sich aus den MIOD_s-Werten der einzelnen Fälle dividiert durch den MIOD_s-Wert von gesundem Knorpelgewebe und müsste bei Chondromen wie bei gesundem Knorpelgewebe somit bei 1 liegen. Als normwertig wurden hier alle euploiden Chondrome (siehe S.34) (AUER 0 und I) gewertet. Dies waren insgesamt 11 Fälle. Der Mittelwert der MIOD_s dieser 11 Fälle betrug 3,6.

Bei den untersuchten Fällen waren unter den Chondrosarkomen II+III° 4 Fälle euploid, 3 Tumore waren aneuploid und 3 konnten nicht zugeordnet werden. Die Chondrosarkome I° zeigten 11 euploide, 2 aneuploide und 1 fraglichen Fall. Die Rezidive der Chondrosarkome wiesen 2 euploide und 3 aneuploide Fälle auf. Unter den Chondromen waren 11 euploide, 5 aneuploide und 1 fraglicher Fall.

Tab.5: Verteilung der integrierten optischen Dichte der einzelnen Tumore

	Anzahl d. Fälle	euploid	aneuploid	fraglich
CHSII+III°	10	4	3	3
CHS I°	14	11	2	1
Rezidive	5	2	3	---
CH	17	11	5	1

Tab.6: Messwerte

	Fall Nr.	IOD _s - Index	MIOD _s	SDIOD _s	CVIOD _s	5cER (%)	AUER- Klassi- fik.
CHS II+III°	1	2,47	8,88	4,52	0,51	4,28	III
	3	2,58	9,28	4,11	0,44	2,9	III
	4	4,47	16,10	8,16	0,55	12,6	IV
	6	2,2	7,91	3,10	0,39	2	III
	7	0,47	1,7	0,75	0,44	---	0
	8	2,44	8,79	3,36	0,38	1,33	III
	9	2,53	9,12	3,89	0,43	2,24	III
	10	2,45	8,82	4,82	0,55	4,64	IV
	11	0,41	1,47	0,58	0,4	---	0
	12	2,26	8,15	3,72	0,46	0,99	III
Rezidive	2	4,03	14,49	5,6	0,39	4,26	III
	5	1,63	5,88	2,6	0,44	---	I
CHS I°	14	2,02	7,28	3,0	0,42	0,66	III
	15	0,49	1,75	0,81	0,46	---	I
	17	1,91	6,9	3,35	0,49	0,98	III
	18	0,61	2,19	0,97	0,44	---	0
	19	1,8	6,48	2,5	0,39	---	I
	20	0,75	2,7	1,32	0,49	---	I
	21	0,38	1,35	0,46	0,34	---	0
	23	1,33	4,79	2,17	0,45	0,66	I
	25	1,96	7,05	2,93	0,42	---	I
	26	2,19	7,88	4,3	0,55	2,3	III
	28	1,99	7,18	3,21	0,45	0,32	I
	29	3,83	13,79	6,01	0,44	12,1	III
	30	0,58	2,1	1,55	0,74	---	I
	31	1,31	4,72	2,38	0,5	2,5	III
Rezidive	16	1,58	5,67	2,8	0,49	1,93	III

	22	2,1	7,42	3,62	0,49	1,98	III
	24	5,73	7,52	5,73	0,76	5,65	IV
CH	32	0,78	2,8	1,65	0,59	0,96	I
	33	2,97	10,68	3,76	0,35	1,64	III
	34	0,47	1,7	0,57	0,33	---	0
	35	0,56	2,03	0,89	0,44	---	0
	36	2,89	10,4	3,82	0,37	6,5	III
	38	2,36	8,5	3,57	0,42	1,99	III
	40	0,87	3,12	0,88	0,28	---	0
	41	2,53	9,1	4,13	0,45	1,9	III
	42	1,02	3,68	1,72	0,47	0,83	I
	43	0,81	2,92	1,43	0,49	0,98	I
	44	0,6	2,15	0,85	0,39	---	0
	45	1,67	6,02	3,09	0,51	1,96	III
	46	2,13	7,65	3,19	0,42	---	I
	48	0,65	2,35	1,01	0,43	---	0
	49	0,66	2,36	0,97	0,41	---	0
	50	2,47	8,89	3,79	0,43	---	I
	51	2,99	10,77	4,62	0,43	4,06	IV

IOD_s-Index =MIOD_s / MIOD_s(Normalgewebe)

MIOD_s =Mittelwert der integrierten optischen Dichte

SDIOD_s =Standardabweichung der integrierten optischen Dichte

CVIOD_s =Variationskoeffizient = SDIOD_s/ MIOD_s

5cER =5c Überschreitungsrage, Anteil hypertetraploider Zellen

Die MIOD_s-Werte zeigten sich bei der Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test signifikant im Zusammenhang mit der Diagnosegruppe (p=0,016). Zusätzlich war eine hohe Signifikanz in Zusammenhang der MIOD_s mit der Kerngröße (p=0,005) zu sehen. Die anderen Parameter zeigten keine Korrelationen mit der MIOD_s.

Tab.7: Auswertung der DNA-Histogramme der einzelnen Tumore nach der AUER-Klassifikation.

Die Histogramme vom Typ II kamen bei keinem der Chondrome oder Chondrosarkome vor. 80% der schlecht differenzierten Chondrosarkome (II+III°) sind in der AUER-Klassifikation den Typen III und IV zuzuordnen. Der höchste Anteil liegt mit 60% in der AUER III Typisierung.

	Anzahl der Fälle	normaler DNA-Gehalt	AUER-Histogramm Typen			
			I	II	III	IV
CHS II+III	10	2	--	--	6	2
Rezidive	2	--	1	--	1	--
CHS I	14	2	7	--	5	--
Rezidive	3	--	--	--	2	1
CH	17	6	5	--	5	1

In den Abbildungen 14-17 werden Verteilungshistogramme einzelner Fälle dargestellt. Auf der X-Achse ist der IOD_s-Index aufgetragen, der bei gesundem Knorpelgewebe bei 1 liegt (s.o.).

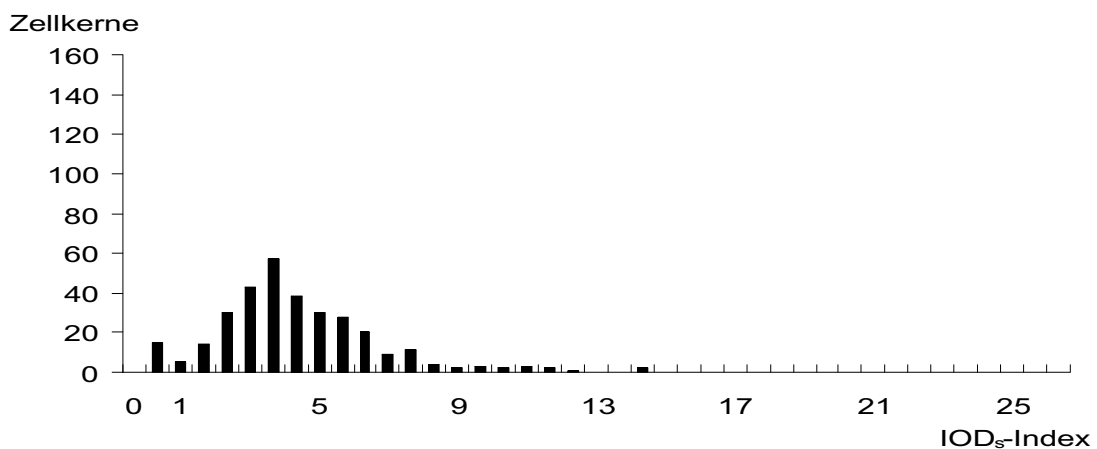


Abb.14: DNA-Verteilungshistogramm Fall Nr.4
(Chondrosarkom III°), AUER IV

Die gut differenzierten Chondrosarkomen I° zeigten überwiegend (50%) den Typ I der AUER-Klassifikation in der DNA Verteilung. Ein weiterer großer Anteil (35,7%) konnte zu dem Typ III gerechnet werden und zwei der Fälle wiesen ein normales Histogramm auf.

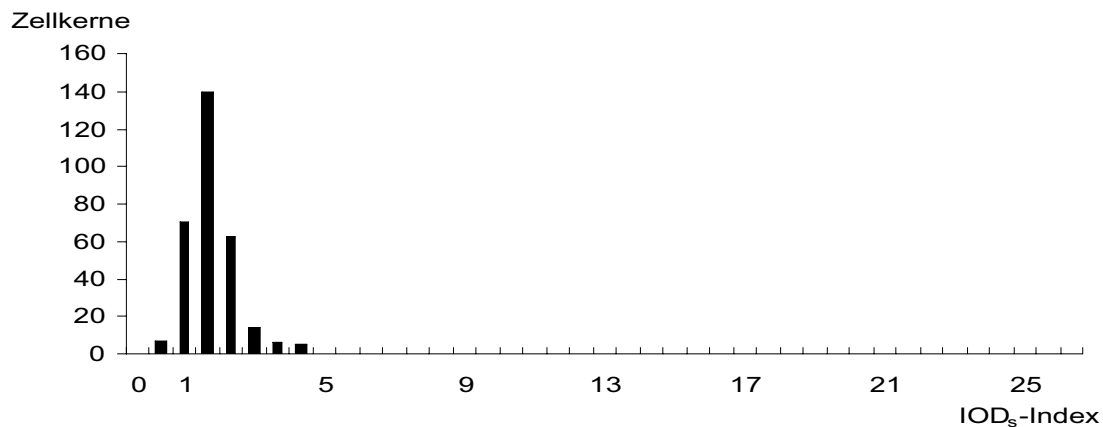


Abb.15: DNA-Verteilungshistogramm Fall Nr.19
(Chondrosarkom I°)AUER I, Trochanter.

Die gutartigen Chondrome hatten zu 2/3 ein normales Histogramm (35,3%) oder ein Typ I nach AUER (29,4%). Nur 1/3 der Chondrome wies einen Typ III nach AUER auf (29,4%). Ein Chondrom musste aufgrund seines Histogrammes zum Typ IV gezählt werden (siehe Abb.16).

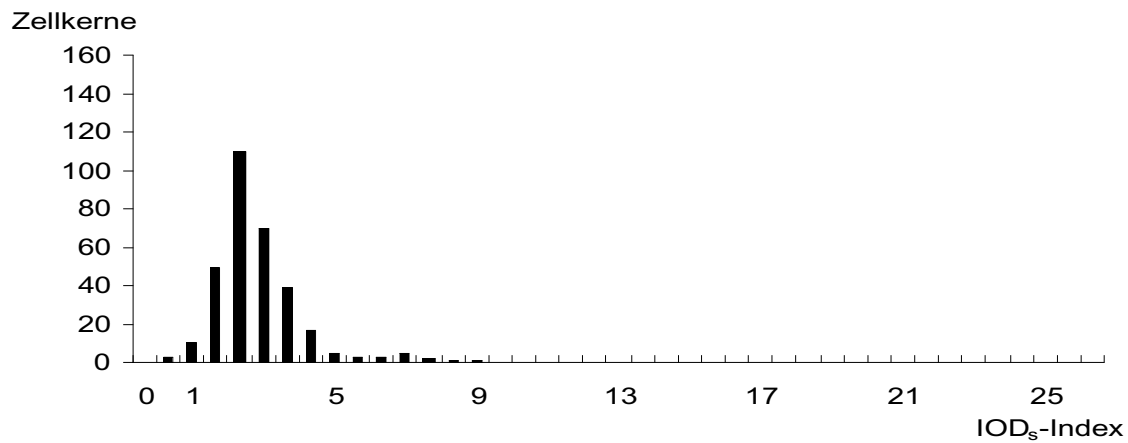


Abb.16: DNA-Verteilungshistogramm Fall Nr. 51
(Chondrom) AUER IV

Bei den Rezidiven der Chondrosarkome zeigten vier der fünf Fälle den AUER Typen III bzw. IV (80%). Nur ein Rezidiv zeigte ein DNA-Histogramm welches keine tetraploiden Zellen enthielt und der AUER I Typisierung zugeordnet wurde.

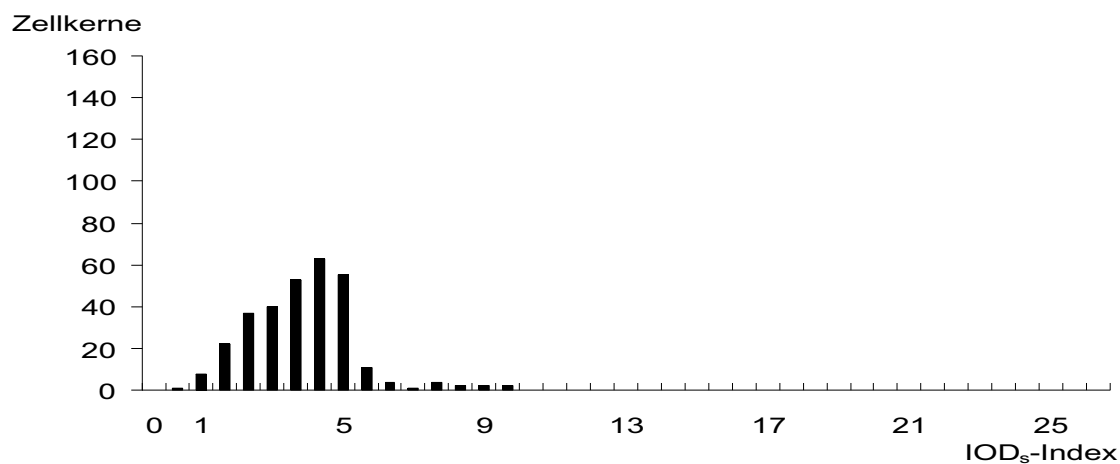


Abb.17: DNA-Verteilungshistogramm Fall Nr.2 Rez.
(CHS III^o) AUER III

Neben der AUER-Klassifikation, der mittleren integrierten optischen Dichte (MIOD_s), deren Standardabweichung (SDIOD_s) und dem CVIOD_s (SDIOD_s/MIOD_s) wurde

auch die 5cER (= der Anteil hypertetraploider Zellen) ausgewertet.

Tab.8: 5cER-Werte der einzelnen Tumore.

Die Mittelwerte der 5cER bei den Chondrosarkomen II+III° und bei den Rezidiven waren höher als bei den gut differenzierten Chondrosarkomen und den Chondromen, bei welchen die Mittelwerte nur geringfügig (0,18%) voneinander abwichen. Die Maximalwerte zeigten jedoch deutliche Differenzen. Der Minimalwert war unter Berücksichtigung aller Werte in allen vier Gruppen null.

	Anzahl der Fälle	5cER-Werte in %		
		Minimum	Maximum	Mittelwert
CHS II+III°	10 (8*)	0 (0,99*)	12,6	3,1 (3,87*)
CHS I°	14	0	12,1	1,4
Rezidive	5	0	5,65	1,76
CH	17	0	6,5	1,22

*ohne Fall 7 und 11

f) Kerngröße

Für die Messung der Kernflächen gilt bezüglich der Fallzahl der untersuchten Tumoren die gleiche Einschränkung wie für die Messung der integrierten optischen Dichte (4.3 e).

Tab.9: Messwerte der bearbeiteten Fälle (in μm^2)

	Fall Nr.	MNA	SDNA	CVNA
CHS II+III°	1	20,19	8,42	0,42
	3	15,28	4,91	0,32
	4	20,77	8,89	0,43
	6	17,14	4,46	0,26
	7	10,93	3,66	0,33
	8	15,43	3,18	0,21
	9	25,93	11,42	0,44
	10	19,86	8,31	0,42
	11	29,35	10,47	0,36
	12	12,94	4,87	0,38
Rezidiv	2	27,66	10,38	0,38
	5	34,72	12,23	0,35
CHS I°	14	16,04	5,99	0,37
	15	14,97	7,46	0,5
	17	13,94	5,87	0,42
	18	9,19	3,18	0,35
	19	16,06	4,28	0,27
	20	8,89	3,61	0,41
	21	10,94	3,71	0,34
	23	17,65	7,07	0,4
	25	15,25	4,42	0,29
	26	15,15	6,2	0,41
	28	21,12	8,3	0,39
	29	22,9	6,72	0,29
	30	12,29	6,97	0,57
	31	13,75	5,04	0,42
Rezidiv	16	16,15	7,21	0,45
	22	24,69	10,75	0,44
	24	19,07	9,7	0,51
CH	32	10,38	3,9	0,38
	33	17,10	4,68	0,27
	34	14,13	8,72	0,62
	35	12,84	4,71	0,37
	36	18,08	6,52	0,36
	38	15,79	5,05	0,32
	40	13,35	3,24	0,24
	41	14,76	5,46	0,37
	42	15,56	6,44	0,41
	43	14,41	3,73	0,26

	44	12,18	4,19	0,34
	45	9,41	3,31	0,35
	46	17,05	6,17	0,36
	48	11,14	4,1	0,37
	49	15,07	7,4	0,49
	50	16,4	5,44	0,33
	51	19,51	6,44	0,33

MNA = Mittelwert der Kernflächen

SDNA = Standardabweichung der Kernflächen

CVNA = Variationskoeffizient (SDNA/MNA)

Bei der Auswertung der Kerngröße mittels Chi-Quadrat-Test zeigte sich, wie oben schon erwähnt, eine Signifikanz im Zusammenhang mit der MIOD_s. Mit den anderen Merkmalsausprägungen konnten sich keine signifikanten Zusammenhänge nachweisen lassen.

Die hochgradigen malignen Tumore und die Rezidive der Chondrosarkome hatten die größten Kernflächen. Die gut differenzierten Chondrosarkome I° zeigten ähnliche Werte wie die benignen Chondrome.

Variationskoeffizient = Standardabw./Mittelwert

Tab.10: Gruppenmittelwerte+Variationskoeffizienten der MNA-Werte (µm²).

	Anzahl d. Fälle	MNA-Werte	
		Mittelwert	Variationskoeffizient
CHS II+III°	10	18,78	0,29
CHS I°	14	14,87	0,26
Rezidive	5	24,46	0,27
CH	17	14,54	0,18

4.4 Zusammenhang zwischen Tumorlokalisation und

a) Gefäßversorgung

Hier wurde die Gefäßversorgung (Lokalisation der Gefäße, Gefäßcharakter) in Zusammenhang mit der Tumorlokalisation, ohne Berücksichtigung des Malignitätsgrades, ausgewertet. Dabei gilt für die Tumorlokalisation die Einteilung in: Stamm, stammnah, stammfern (wie oben definiert). Im Folgenden wird zunächst die Gefäßlokalisation in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation untersucht.

Die am Stamm lokalisierten Tumore wiesen zum Großteil Gefäße in den tumorösen Arealen auf (80%). In nur 20% der Fälle waren keine Gefäße nachweisbar. Bei den stammnah gelegenen Tumoren bestand ein relativ ausgewogenes Verhältnis von 57,7% zu 42,3%. Die stammfern gelegenen Befunde zeigten zum Großteil (80%) keine Gefäße in den tumorösen Arealen, was der umgekehrten Relation der am Stamm lokalisierten Fälle entspricht. Dies wird im nachstehenden Säulendiagramm (Abb.18) veranschaulicht.

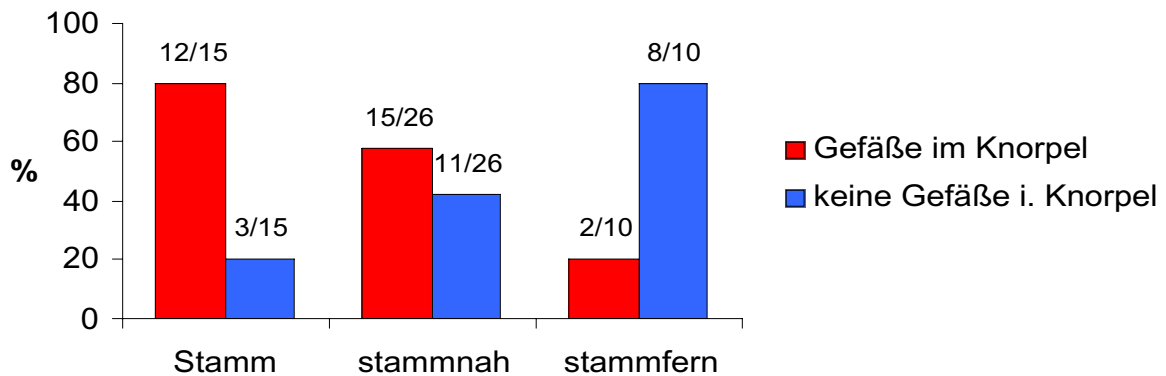


Abb.18: Gefäßvorkommen in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation

Bei der Signifikanzanalyse mittels Chi-Quadrat-Test zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Gefäßlokalisation und Tumorlokalisation ($p=0,012$).

Weiterhin wurde die Gefäßgröße (kapillär, kavernös) gegenüber der Tumorlokalisation aufgetragen. wobei sich keine ausgeprägte Signifikanz ($p=0,079$) darstellte.

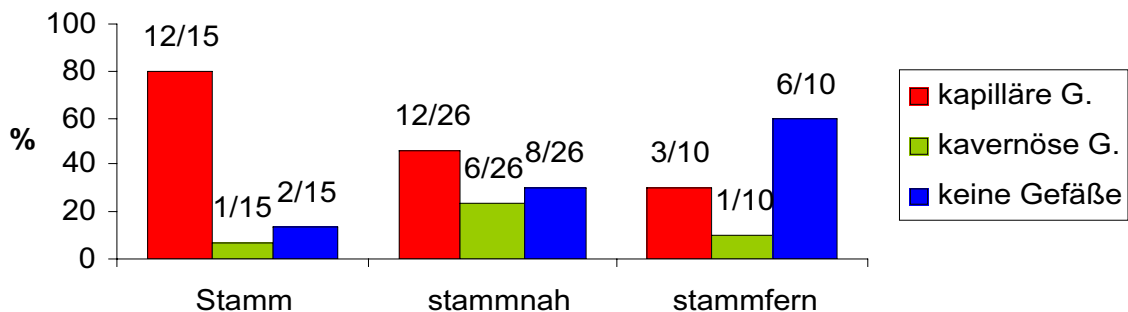


Abb.19: Gefäßgröße in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation.

Die am Stamm lokalisierten Tumore wiesen zum größten Teil kapilläre Gefäße auf. Kavernöse Gefäße oder kein Gefäßvorkommen zeigten nur drei Tumore. Bei den hier lokalisierten Tumoren handelte es sich ausschließlich um Chondrosarkome. Bei den stammnah gelegenen Tumoren traten hauptsächlich kapilläre Gefäße auf (46,1%). Kavernöse und keine Gefäße traten zu ungefähr gleichen Teilen auf. Die stammfern gelegenen Tumore zeigten zum überwiegenden Teil (60%) keine Gefäße. In 3 Fällen zeigte sich hier eine Angiogenese und einmal wurde ein Tumor durch kavernöse Gefäße versorgt.

b) Integrierte optischen Dichte

Bei der Prüfung des Zusammenhangs der MIOD_s der einzelnen Tumore und der Tumorlokalisation mittels Chi-Quadrat-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,099 kein signifikantes Ergebnis.

Tab.11: Verteilung des DNA-Gehaltes der verschieden lokalisierten Tumore.

Lokalisation	euploid	aneuploid	fraglich	Gesamt
Stamm	9	5	1	15
stammnah	13	5	4	22
stammfern	6	3	0	9
Gesamt	28	13	5	46

Die Tumore, die ein aneuploides Zellbild zeigten, waren zu gleichen Teilen am Stamm und stammnah lokalisiert. Ein euploides Zellbild (siehe S.34) trat am

häufigsten bei den stammnah gelegenen Tumoren auf. Insgesamt zeigte der Hauptteil aller Tumore ein euploides Zellbild, insbesondere auch die höhergradigen malignen Tumore, welche am Stamm lokalisiert waren.

Tab.12: Auswertung der DNA-Histogramme der verschieden lokalisierten Tumore nach AUER

Lokalisation	normaler DNA-Gehalt	AUER Histogramm Typen				Gesamt
		I	II	III	IV	
Stamm	1	4	--	8	2	15
stammnah	6	6	--	9	1	22
stammfern	3	3	--	2	1	9
Gesamt	10	13	--	19	4	46

Diese Auswertung zeigte, dass der Hauptteil der Typ III Histogramme bei den stammnah und am Stamm gelegenen Tumoren auftrat. Die Typ IV Histogramme bestanden zur Hälfte bei den am Stamm lokalisierten Tumoren, wobei dies jedoch nur zwei von vier waren.

Die Typ I Histogramme traten relativ gleichmäßig bei allen Lokalisationen auf. Wenn man die totale Anzahl der jeweiligen Lokalisation sieht, sind dies für die stammfern gelegenen Tumore 33,3%, für die stammnah gelegenen 27,3% und für die am Stamm gelegenen nur 26,7%.

Ein normales Verteilungshistogramm zeigten jedoch nur 6,7% der am Stamm lokalisierten, 27,3% der stammnah gelegenen und 33,3% der stammfern gelegenen Tumore. Bei den stammfern gelegenen Tumoren wiesen also 66,6% ein Histogramm ohne aneuploide Zellen auf.

c) Kerngröße

Bei der Auswertung der Kerngröße in bezug auf die Tumorlokalisation mittels Chi-Quadrat-Test zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ($p=0,457$).

Tab.13: Gruppenmittelwerte + Variationskoeffizienten der MNA-Werte (μm^2) der verschieden lokalisierten Tumore.

Lokalisation	MNA-Werte		Anzahl d. Fälle
	Variationskoeffizient	Mittelwert	
Stamm	0,31	20,31	15
stammnah	0,27	14,41	22
stammfern	0,13	15,98	9
Gesamt			46

Variationskoeffizient = Standardabw./Mittelwert

Bei der Gegenüberstellung von MNA-Werten und der Tumorlokalisation zeigte sich somit eine deutlich geringere Signifikanz als bei der Korrelation von MNA-Wert und Malignitätsgrad. Die am Stamm lokalisierten Tumore, bei denen es sich ausschließlich um Chondrosarkome handelte, hatten eindeutig die größten Kernflächen. Bei den stammnah und stammfern gelegenen Tumoren, hier handelte es sich hauptsächlich um Chondrosarkome I° und Chondrome, zeigten sich relativ identische Werte, wobei die stammnah gelegenen eine größere Spannweite (min.-max.) aufwiesen. Hierbei waren sowohl Chondrosarkome als auch Chondrome vertreten. Im Gegensatz dazu waren die stammfern gelegenen Tumore ausschließlich Chondrome.

4.5 Zusammenhang zwischen Gefäßversorgung und

a) Integrierter optischen Dichte

Es wurde die Abhängigkeit der DNA-Verteilungshistogramme in der Klassifizierung nach AUER und deren 5cER-Werte von der Gefäßversorgung der verschiedenen Tumore untersucht.

Tab.14: Auswertung der DNA-Histogramme nach AUER in bezug auf die Gefäßlokalisierung.

Der Hauptteil der Tumore, welcher Gefäße im Tumor aufwies, zeigte auch einen AUER Histogramm Typ III oder IV (67,8%). Nur 22,2% zeigten einen Histogramm Typ I oder einen normalen DNA-Gehalt. Bei den Tumoren ohne Gefäße im chondromatösen Anteil war das Verhältnis umgekehrt.

Lokalisation der Gefäße	normaler DNA-Gehalt	AUER Histogramm Typen				Anzahl der Fälle
		I	II	III	IV	
Gefäße im Knorpel	5	4	--	15	4	28
keine Gefäße im Knorpel	5	9	--	4	---	18
Gesamt	10	13	--	19	4	46

Tab.15: Auswertung der 5cER-Werte in bezug auf die Gefäß-lokalisierung

Lokalisation der Gefäße	5cER-Wert (%)			Anzahl der Fälle
	Min.	Max.	Mittelw.	
Gefäße im Knorpel	0	12,6	2,62	28
keine Gefäße im Knorpel	0	2,5	0,65	18
Gesamt				46

Anschließend wurden die gleichen Parameter im Zusammenhang mit dem Gefäßcharakter aufgezeigt.

Tab.16: Auswertung der DNA-Histogramme nach AUER in bezug auf den Gefäßcharakter.

Der Großteil der Tumore mit kapillärem Versorgungstyp wies AUER Histogramme vom Typ III und IV auf (64%). Der Rest zeigte normale oder Typ I Histogramme. Bei dem kavernösen Versorgungstyp lag ein ausgeglichenes Verhältnis vor. Die Mehrzahl der Tumore ohne Gefäßversorgung hatte einen normalen DNA-Gehalt oder ein Histogramm vom Typ I.

Gefäßgröße	normaler DNA Gehalt	AUER Histogramm Typen				Anzahl d. Fälle
		I	II	III	IV	
kapillär	4	5	--	13	3	25
kavernös	2	2	--	3	1	8
keine Gefäße	4	6	--	3	---	13
Gesamt	10	13	--	19	4	46

Tab.17: Auswertung der 5cER-Werte in bezug auf die Gefäßgröße

Gefäßgröße	5cER-Werte(%)			Anzahl der Fälle
	Min.	Max.	Mittelwert	
kapillär	0	12.1	2.6	25
kavernös	0	5.65	1.4	8
keine Gefäße	0	2.5	0.68	13
Gesamt				46

Bei beiden Merkmalen, Gefäßgröße und -lokalisation, zeigte sich im Zusammenhang mit dem DNA-Gehalt keine ausgeprägte Signifikanz (Gefäßgröße: $p=0,365$; Gefäßlokalisation: $p=0,061$).

b) Kerngröße

In den nun nachfolgenden Tabellen wird die Kerngröße gegenüber der Gefäßlokalisation und des Gefäßcharakters aufgetragen.

Tab.18: Kerngröße (μm^2) in bezug auf die Gefäßlokalisation.

Der Minimalwert war in beiden Fällen fast gleich. Bei Tumoren mit Gefäßen im Knorpel lag er sogar etwas niedriger. Der Maximal- und Mittelwert lag jedoch deutlich höher als bei Tumoren ohne Gefäße in den tumorösen Arealen.

Lokalisation der Gefäße	MNA-Werte			Anzahl d. Fälle
	Min.	Max.	Mittelwert	
Gefäße im Knorpel	8.89	34.72	17.74	28
keine Gefäße im Knorpel	10.38	21.12	14.93	18
Gesamt				46

Tab.19: Kerngröße (μm^2) in bezug auf die Gefäßgröße.

Die Minimalwerte aller drei Kategorien liegen in einem ähnlichen Bereich. Bei den Maximal- und Mittelwerten kam es zu einer Abhebung der Tumore mit kapillärem Versorgungstyp von den Tumoren mit kavernösem Versorgungstyp oder ohne Gefäße, die beide ähnliche Größenwerte aufwiesen, wohingegen der kapilläre Typ sich deutlich von den anderen mit höheren Werten, also größeren Kernen, abgrenzte.

Gefäßgröße	MNA-Werte			Anzahl d. Fälle
	Min.	Max.	Mittelwert	
kapillär	8.89	34.72	18.32	25
kavernös	9.41	21.12	15	8
keine Gefäße	12.18	17.65	15.01	13
Gesamt				46

Im Chi-Quadrat-Test konnte weder zwischen Gefäßgröße und Kernflächengröße ($p=0,718$) noch zwischen Gefäßlokalisation und Kernflächengröße ($p=0,444$) eine Signifikanz dargestellt werden.

5. DISKUSSION

5.1 Gefäßversorgung

Der Zusammenhang von Angiogenese und Dignität bzw. der Eigenschaft eines Tumors zu metastasieren oder Rezidive zu bilden wurde bereits in einer Vielzahl von Studien für verschiedene Tumore gezeigt.

FRANK (1995) führte immunhistochemische Färbungen an Colonkarzinomen mit Faktor VIII Antigen durch, um die Angiogenese der Tumore darzustellen. Über die Auswertung von Vorkommen und Anzahl von Gefäßen kam er zu dem Schluss, dass die Angiogenese bei Colonkarzinomen ein wichtiger Faktor für das Verhalten des Tumors ist, und insbesondere das Auftreten von Rezidiven und die Überlebensrate beeinflusst.

Für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome wurden ebenfalls Studien durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass die Anzahl an Mikrogefäßen positiv mit dem Auftreten von Rezidiven und der Höhe des Tumorstadiums korreliert. Außerdem hatten Patienten, die bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen, ebenfalls eine höhere Dichte an Mikrogefäßen als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (YUAN 1995, FONTANINI 1995). Für Adenokarzinome der Lunge konnte dies nur teilweise bestätigt werden. Es fand sich zwar ein positiver Einfluss für Rezidive und hämatogene

Metastasen, jedoch nicht für Lymphknotenmetastasen (YAMAZAKI 1994).

Für weitere Karzinomlokalisationen wie in der Mamma (CHU 1995, TOI 1994, OBERMAIR 1994), der Blase (BOCHNER 1995), der Prostata (BRAWER 1994), dem Uterus (KAINZ 1995), den Ovarien (HOLLINGSWORTH 1995), dem Magen (MAEDA 1995), der Mundhöhle (WILLIAMS 1994), dem Kopf-/ Halsbereich (DRAY 1995), dem Rektum (SACLARIDES 1994) und für das maligne Melanom (GRAHAM 1994) wurden ähnliche Studien durchgeführt. Es wurde in den meisten Fällen eine Darstellung der Gefäße durch eine immunhistochemische Färbung mit Faktor VIII oder CD 34 durchgeführt. Anschließend wurden die Gefäße unter dem Lichtmikroskop gezählt. In den meisten Fällen zeigte sich eine positive Korrelation der Mikrogefäßdichte mit der Metastasierungshäufigkeit des Tumors, der Tumorgroße, dem Tumorstadium und der Überlebensrate. Bei den Karzinomen des Kopf-/Halsbereiches (DRAY 1995) war kein Zusammenhang zu erkennen. Bei Karzinomen des Uterus fand sich kein Zusammenhang bezüglich der Lymphknotenmetastasierung (KAINZ 1995). Des weiteren bestehen Zusammenhänge zwischen der Konzentration bestimmter Proteine des Hämostasesystems aus dem Tumorextrakt verschiedener Tumore und deren Malignität bzw. Prognose.

Hochsignifikante Korrelationen werden hier z.B. zwischen der Konzentration von Urokinase plasminogen aktivator (uPA) und PAI-1 im Tumor und einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom beschrieben.

Vor allem bei Mammakarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen geben sie Auskunft über die Aggressivität des Tumors (DUFFY 1998, 2002).

Studien über die Gefäßversorgung und Angiogenese bei Chondrosarkomen gab es bisher sehr wenig. KLÜMPER (1977) führte eine Untersuchung über die Bedeutung der intraossären Angiographie für primär maligne Knochentumore durch, wobei er herausfand, dass diese bei Chondrosarkomen aufgrund der hier bestehenden generellen Gefäßarmut den malignen Charakter nicht darzustellen vermag. Auch ACKERMANN (1971), DAHLIN (1967), und LICHTENSTEIN (1965) beschrieben eine solche Gefäßarmut auf der überwiegenden Anzahl histologischer Schnitte der Chondrosarkome.

Mit der Möglichkeit von immunhistochemischen Färbungen und damit der Darstellung von Endothel durch verschiedene Antikörper ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Mikrogefäße lassen sich so sichtbar machen und, wie hier gezeigt werden konnte, tritt gerade bei hochmalignen Chondrosarkomen III°, jedoch auch bei den Chondrosarkomen I° und II° eine Angiogenese auf. Ob dies nun als sicheres Diagnosekriterium zur Unterscheidung zum benignen Chondrom dient und in wie weit dies zur Planung der Therapie eingesetzt werden kann, wird anhand der vorliegenden Untersuchung diskutiert.

MC GOUGH (2002) beschrieb ebenfalls eine Korrelation der Angiogenese in Chondrosarkomen und Chondromen, mit der Aggressivität des Tumors und dem Tumorstadium. Er fand eine größere Anzahl von

kapillären Gefäßen in hochgradigen Tumoren, als in gut differenzierten oder benignen Tumoren.

Des weiteren gibt es Studien, in denen der Zusammenhang von VEGF und Knorpeltumoren untersucht wurde.

Es wurden hier deutlich höhere Konzentrationen von VEGF im Serum von Patienten mit malignen Knochentumoren beschrieben, als bei gesunden Patienten (HOLZER 2001). Außerdem ist VEGF ein potenter Angiogenese-Faktor bei Knorpeltumoren, der nur bei Tumoren mit Angiogenese nachweisbar ist und der fehlt, wenn keine Gefäße im Tumor auftreten (AYALA 2000).

MC GOUGH (2002) untersuchte in diesem Zusammenhang neben dem Auftreten von VEGF, zusätzlich das Auftreten des Fibroblast growth factor bei Knorpeltumoren mit und ohne Angiogenese. Hier zeigten sich jedoch nahezu keine Unterschiede in der Konzentration des FGF.

Da es mit dem „angiogenic switch“, also dem Einsetzen der Angiogenese, zu einem Tumorwachstum und einer Erhöhung der Metastasepotenz des Tumors kommt, ist die beschriebene hohe Korrelation der VEGF-expression von Knorpeltumoren, bei dem Auftreten einer Angiogenese in diesen Tumoren, von großer Bedeutung für das Tumorgrading, die chirurgische Therapie und vor allem für eine potentielle Behandlung mit Antiangiogenese-Chemotherapeutika (MC GOUGH 2002).

In dieser Studie trat eine Angiogenese bei nahezu allen malignen Tumoren (CHS I°, II°, III°), sowie bei allen Rezidiven auf.

Ein mögliches Problem für die Aussagekraft dieser Arbeit ist die Auswertung der Gefäßversorgung (Anzahl, Lokalisation und Größe bzw. Charakter der Gefäße) aufgrund von subjektiver Einschätzung durch den Untersucher und nicht durch konkrete Auszählung der Gefäße pro Fläche bzw. Messungen der Gefäßgröße. Die individuelle Einschätzung ist jedoch bei der Beurteilung der Gefäßlokalisation nur durch einen Vergleich zwischen den verschiedenen Färbungen möglich. Die tumorösen Areale mussten mittels S 100 Färbung ermittelt werden und dann auf die CD 34 gefärbten Präparate übertragen werden, um die Lokalisation der Gefäße zum tumorösen Anteil des Präparates zu beurteilen. Hier zeigte die subjektive Beurteilung durch immer den gleichen Begutachter die nachvollziehbareren Ergebnisse. Gleiches gilt für die Messung des Gefäßcharakters. Durch Mehrfachanschnitte von großen kavernösen Gefäßen kann eine Angiogenese vorgetäuscht werden und somit falsch-positive Ergebnisse entstehen.

5.2 Integrierte optische Dichte und Kerngröße

Über den Zusammenhang zwischen der DNA-Zytometrie und dem Malignitätsgrad von Tumoren gibt es mehrere

Studien. SHIH (1996) zeigte z.B. eine Korrelation des Tumorgades mit dem DNA-Gehalt.

Ebenfalls wurde dies von HELIO (1995) demonstriert, die in einer Studie mit 52 Patienten zu dem Schluss kam, dass die DNA-Zytometrie eine entscheidende Rolle bei der Planung der Behandlung von Chondrosarkomen spielt, da sich eine Korrelation zwischen dem biologischen Verlauf (Rezidiven, Metastasen) und dem Grad der Aneuploidie zeigte.

Hochdifferenzierte Tumore wie Chondrosarkome I° bilden in der Regel in ihrem DNA-Verteilungsmuster eine Stammlinie im hyperdiploiden Bereich aus. Nur die erhöhte integrierte optische Dichte (Hyperchromasie) und die Abweichung der DNA-Werte (Aneuploidie) zeigen ihre Malignität. Im Gegensatz dazu würden benigne Tumore ein diploides Bild aufweisen.

Ein sicherlich bestehendes Problem bei der DNA-Messung an Paraffinschnitten zur Dignitätsbestimmung und einer der entscheidenden Gründe, warum dies weitgehend nicht mehr erfolgt, ist der hohe Zellgehalt in den meisten Tumorgeweben, welcher zu Kernüberlappungen und damit ungenauen nicht reproduzierbaren Messungen führt.

Ähnliches gilt für die Schnittebene. Große Zellkerne werden durchschnittlich häufiger angeschnitten als kleine Zellkerne. Dies führt zu einer Unterschätzung des DNA-Gehalt der Zellkerne, da sie durch diese Problematik auch seltener vollständig in der Schnittebene liegen als kleine Zellkerne.

Es handelt sich bei Knorpel um ein Gewebe mit einem niedrigen Zellgehalt. Das Problem der Kernüberlappung, das heute weitgehend zum Verlassen dieser Methode geführt hat, ist deshalb hier von untergeordneter Rolle. Daher wurde in dieser Studie eine DNA-Analyse durchgeführt. Es können jedoch auch hier geringe Zählungenauigkeiten aufgrund einer möglichen Schnittdickenschwankung auftreten.

Bei der Messung der Kerngröße stellt sich ein ähnliches Problem. Gemessen wurde hier nur das Profil eines Zellkerns in der Schnittebene. Analog der DNA-Messung hängt das Ergebnis von der Schnittebene ab, in der sich der Zellkern befindet. Auch hier können große Zellkerne zu einer Unterschätzung ihrer eigentlichen Größe führen, da sie häufiger angeschnitten werden und die Schnittebenen nicht immer im Zentrum liegen.

5.3 Prognostische Bedeutung der Ergebnisse für einzelne Fälle

Die gesamte Problematik in der Einteilung der Dignität von Knorpeltumoren spiegelt sich in der Unterscheidung zwischen Chondromen und hochdifferenzierten Chondrosarkomen wieder. Das histologische Erscheinungsbild lässt sich mittels konventioneller Diagnostik nur schwer differenzieren. Andererseits hat die Festlegung des Dignitätsgrades einen entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf des

Krankheitsbildes, da die Chondrosarkome eine onkologisch radikalere Therapie als die benignen Chondrome zur Vermeidung eines Rezidivs erfordern.

Die Konsequenz aus der Dignitätsbestimmung kann beim zentral gelegenen Tumor große Auswirkung auf die weitere Lebensqualität haben. Der Unterschied zwischen einer für das Chondrom ausreichenden Kürettage und der radikalen - evtl. verstümmelnden - Resektion im Bereich des Beckens oder des Thorax ist offensichtlich. Eine falsch-positive Einschätzung hätte somit für den Patienten fatale Folgen.

Bei den Chondromen, die als Chondrosarkome I° aufgrund der vorliegenden Ergebnisse reklassifiziert werden müssten, stellt sich in diesem Zusammenhang allerdings die Frage, ob primär doch ausreichend radikal therapiert wurde, da bis zum jetzigen Zeitpunkt in dieser Gruppe kein Rezidiv aufgetreten ist. Die Chondrome hatten zum überwiegenden Anteil (80%) keine Gefäße direkt im Knorpel. In vier Fällen wiesen sie jedoch Gefäße auf. Dabei handelte es sich 2x um kapilläre Gefäße (Fall Nr. 36 und 51) und 2x mal um kavernöse Gefäße (Fall Nr. 45 und 48). In diesen Fällen stand, auch aufgrund anderer Parameter und dem histologischen Erscheinungsbild, eine Umgruppierung in die Klasse der Chondrosarkome I° zur Diskussion. Diese Fälle waren auch in der primären histologischen Beurteilung zunächst problematisch.

Die schwierige histologische Klassifikation zur Unterscheidung von Chondromen versus Chondrosarkomen

wird hier durch die Gefäßklassifikation ergänzt bzw. relativiert.

Bei zwei der vier Tumore (Fall Nr.45 und 48) war der Tumor am Femur lokalisiert und die Patienten befanden sich in der fünften (w) bzw. sechsten (m) Lebensdekade. Es zeigten sich in der DNA-Zytometrie jedoch keine aneuploiden Zellen. Die anderen zwei Fälle (Fall Nr.36 und 51) waren stammfern lokalisiert (Digitus), imponierten jedoch auch in der DNA-Analyse, wo sich aneuploide Zellen zeigten, eher wie Chondrosarkome (AUER III+IV).

Desweiteren gab es einen Fall (Nr.33) unter den 20 Chondromen der kapilläre Gefäße in unmittelbarer Nähe zum Tumor aufwies. Es hatten also insgesamt drei der Chondrome kapilläre Gefäße. Diese zeigten auch DNA-Histogramme vom Typ AUER III bzw. IV mit einem aneuploidien Zellbild.

Retrospektiv waren diese Tumoren auch bei der histologischen Untersuchung aufgrund ihres Zellreichtums und ihrer Atypien nur grenzwertig in die Gruppe der Chondrome einzuordnen.

Bei den Chondrosarkomen I° traten vier Fälle auf, bei denen keine Gefäße in den tumorösen Arealen gefunden wurden. Zwei Fälle waren am Stamm (Becken) lokalisiert (Fall Nr.23 und 24), hier existierte zu wenig Material, um eine sichere Aussage bezüglich des Gefäßverhaltens treffen zu können. Die anderen beiden Fälle waren am Trochanter und an der distalen Tibia lokalisiert (Fall Nr.15 und 31). In beiden Fällen war trotz ausreichend vorhandenem Material kein Gefäß

nachweisbar. Beide DNA-Histogramme waren zudem euploid, was den Eindruck der Fehlklassifikation unterstützt.

Ein CHS I° (Fall Nr.28) wies lediglich kavernöse Gefäße in unmittelbarer Umgebung des Tumors auf. Der Tumor war am distalen Femur lokalisiert und das DNA-Histogramm war auch hier euploid.

In den drei letzt genannten Fällen ist aufgrund der Zusammenschau der einzelnen Dignitätsparameter in oben definiertem Sinne das Vorliegen eines benignen Prozesses und damit eine falsch-positive Malignitätseinstufung denkbar.

Das einzige Rezidiv (Fall Nr.32), welches in der Gruppe der Chondrome auftrat, war, wie die Rezidive der Chondrosarkome ebenfalls, sehr stammnah lokalisiert (Humeruskopf). Hier konnte man jedoch bei der Untersuchung des Primärtumors weder aufgrund der DNA-Analyse noch aufgrund der Gefäßversorgung auf einen höheren Malignitätsgrad oder ein später mögliches Rezidiv schließen. Man muß hier an ein von Tumorrestgewebe ausgehendes Rezidiv denken (lt. histol. KT 16/89).

Somit ist, analog der Klassifikation aufgrund der Angiogenese, auch hier durch die Einstufung mittels IOD_s und Kerngröße eine exaktere Differenzierung im Vergleich zur herkömmlichen - allein aufgrund der allgemeinen histologischen Kriterien - Klassifikation möglich.

Bei der Messung der Kerngröße und der IOD_s gab es zwei Fälle unter den Chondrosarkomen II° (Nr.7 und 11),

welche ein normales DNA-Verteilungshistogramm aufwiesen und vermeintlich aus der Beurteilung auszuschließen sind, da beide Fälle aufgrund der Färbung und des geringen Zellanteils nur schlecht einzustufen waren. In den anderen Parametern (Angioneogenese, Tumorlokalisation, histologischem Erscheinungsbild) stimmten sie eindeutig mit hochgradigen Chondrosarkomen überein.

Aufgrund der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse scheint eine Möglichkeit gegeben zu sein, die extrem schwierige Klassifikation von Knorpeltumoren bzgl. ihres Dignitätsgrades zu verifizieren. Die untersuchten Parameter (Gefäßcharakter, Gefäßlokalisation, Kerngröße und IOD_s) korrelieren mit dem Dignitätsgrad, der Rezidivrate und der Prognose.

Vorbehaltlich der bis jetzt für statistische Zwecke kleinen Fallzahl scheint es mit den untersuchten Beurteilungskriterien möglich zu sein, die Klassifikation der Knorpeltumore in Chondrome und Chondrosarkome verschiedener Malignitätsgrade exakter und sicherer durchzuführen. Eine solche für die Therapieplanung und Prognose wichtige exakte Beurteilung wäre für die Überlebensrate und nicht zuletzt auch für die Lebensqualität der einzelnen Patienten von entscheidender Bedeutung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurde die Problematik der Differenzierung von hochdifferenzierten Chondrosarkomen (CHS I°) versus Chondromen, welche sich in ihrem histologischen Bild sehr ähnlich sind, jedoch unterschiedlicher Therapien bedürfen, behandelt.

Die Angiogenese sowie die DNA-Zytometrie haben als Merkmale zur Diagnosestellung von malignen Tumoren verschiedensten Charakters und deren Prognose einen hohen Stellenwert erreicht (YUAN 1995, FONTANINI 1995). Besonders bei Mammakarzinomen wird die Angiogenese als prognostischer Faktor für das Auftreten von Rezidiven (OBERMAIR 1994) und Lymphknotenmetastasen (TOI 1994) genutzt.

In dieser Studie sollte der Stellenwert der Angiogenese und der DNA-Zytometrie als prognostischer Faktor zur Unterscheidung der hochdifferenzierten Chondrosarkome I° versus Chondrome aufgezeigt werden.

Durch immunhistochemische Färbungen, welche die Tumorlokalisation und die Gefäßversorgung darstellen, wurde das Ausmaß der Angiogenese, bzw. der Charakter der Gefäßversorgung der einzelnen Tumore ausgewertet.

Hierfür erfolgte eine Korrelation mit der Stadieneinteilung der Tumore, mit dem Ausmaß der Angiogenese und der klinischen Daten.

In gleicher Weise wurden die zytometrischen Merkmale der Tumore über Messungen der Kerngröße und des DNA-Gehaltes erhoben und mit klinischen Daten und der

bisherigen Stadieneinteilung korreliert.

Es zeigten sich hochsignifikante Ergebnisse zwischen der Gefäßversorgung (Gefäßgröße und -lokalisation) der Tumore, deren Lokalisation und Diagnosegruppe. Die hochgradigen malignen Chondrosarkome II+III° zeigten alle eine Angiogenese. Bei den Chondrosarkomen I° zeigte sich in nur vier von 19 Fällen keine Angiogenese.

Die Chondrome dagegen wiesen in nur vier Fällen eine Angiogenese auf. Die übrigen 16 untersuchten Tumore zeigten keine Gefäße im Tumor.

Die hohe Korrelation der Tumorlokalisation mit der Angiogenese ist auf die Lokalisation der hochgradig malignen Chondrosarkome am Stamm und der Chondrome in der Peripherie zurückzuführen. Das Vorliegen oder Auftreten von Angiogenese ist somit als zusätzlicher Parameter zur Differenzierung von chondroiden Tumoren verwertbar.

Bei der Auswertung der DNA-Zytometrie der einzelnen Tumore zeigte sich in dieser Studie lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IOD_s und der Diagnosegruppe.

Chondrosarkome II+III° zeigten fast ausschließlich DNA-Histogramme vom Typ AUER III und IV. Bei den Chondrosarkomen I° und den Chondromen zeigten sich jedoch keine signifikanten Ergebnisse, so dass hier eine Differenzierung aufgrund der DNA-Zytometrie nicht möglich ist. Sie kann lediglich als zusätzlicher prognostischer Parameter in Zusammenhang mit den weiteren Parametern dienen.

Die hier aufgeführten Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass die durchgeführten Untersuchungen bei der Klassifikation der Knorpeltumore und deren Dignitätseinteilung zu einer konkreten Verbesserung in bezug auf Sicherheit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit führen können.

7. ABKÜRZUNGSLEGENDE

ABC-Technik	= Avidin Biotin Complex-Technik
CH	= Chondrom
CHS	= Chondrosarkom
CV	= Variationskoeffizient
CVIOD _s	= Variationskoeffizient der IOD _s
CVNA	= Variationskoeffizient der NA
5cER	= 5c-exceeding rate
Dist.	= distal
FGF	= Fibroblast growth factor
HE	= Hämalaun-Eosin
IOD _s	= integrierte optische Dichte
Li.	= links
LSAB-Technik	= Labeled Streptavidin Biotin-Technik
M	= männlich
MIOD _s	= Mittelwert der IOD _s
MNA	= Mittelwert der NA
NA	= nuclear area
PAI-1	= plasminogen aktivator inhibitor
Prox.	= proximal
Re.	= rechts
Rez.	= Rezidiv
SDIOD _s	= Standardabweichung der IOD _s
SDNA	= Standardabweichung der NA
TGF	= tumor growth factor
VEGF	= vascular endothelial growth factor
VWF	= von Willebrand Faktor
W	= weiblich

8. LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMANN LV, SPJUT HJ

Tumors of bone and cartilage. Nat Res Council (1971)

ADLER CP, HERGET GW, NEUBURGER M (1995)

Cartilaginous tumors: prognostic applications of cytophotometric DNA analysis. Cancer 76: 1176-1180

AUER GU, CASPERSSON TO, WALLGREN AS (1980)

DNA content and survival in mammary carcinoma. Anal Quant Cytol 2: 161-165

AYALA G, LIU C, NICOSIA R, HOROWITZ S, LACKMAN R (2000)

Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. Hum Pathol 31: 341-346

BÖCKING A, ADLER CP, COMMON HH, HILGARTH M, FRANZEA B, AUFFERMANN W (1984)

Algorithm for a DNA-Cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. Anal Quant Cytol 6: 1-8

BÖCKING A, CHATELAIN R

Automated Feulgen staining with a temperature controlled Varistain 24. Academic Press, Oxford (1986)

BOENISCH TH

Antikörper. Handbuch immunchem Färbemethoden II. DAKO
(1983)

BOCHNER BH, COTE RJ, WEIDNER N, GROSHEN S, CHEN SC,
SKINNER DG, NICHOLS PW (1995)

Angiogenesis in bladder cancer: relationship between
microvessel density and tumor prognosis. J Natl
Cancer Inst 87: 1603-1612

BRAWER MK, DEERING RE, BROWN M, PRESTON SD, BIGLER SA
(1994)

Predictors of pathologic stage in prostatic
carcinoma. The role of neovascularity. Cancer 73:
678-687

BLOODGOOD JC (1920)

The diagnosis and treatment of benign and malignant
tumors of bone. J Radiol 1: 147-168

BOEHM T, FOLKMAN J, BROWDER T, O`REILLY MS (1997)

Antiangiogenic therapy of experimental cancer does
not induce acquired drug resistance. Nature 27: 404-
407

CHU JS, LEE WJ, CHANG TC, CHANG KJ, HSU HC (1995)

Correlation between tumor angiogenesis and metastasis
in breast cancer. J Formos Med Assoc 94: 373-378

CODMAN EA (1925)

The nomenclature used by the registry of bone sarcoma. Am J Roentgenol 13: 105-126

DAHLIN PC

Bone Tumors. Thomas, Springfield (1967)

DRAY TG, HARDIN NJ, SOFFERMAN RA (1995)

Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. Ann Otol Rhinol Laryngol 104: 724-729

DUFFY MJ, DUGGAN C, MULCAHY HE, MC DERMOTT EW, O`HIGGINS NJ (1998)

Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease. Clin Chem 44: 1177-1183

DUFFY MJ (2002)

Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. Clin Chem 48: 1194-1197

EIJAN AM, DAVEL L, OISGOLD-DAGA S, DE LUSTIG ES (1991)

Modulation of tumor induced angiogenesis by proteins of extracellular matrix. Mol Biother 3: 38-40

EWING J (1922)

A review and classification of bone sarcomas. Arch Surg 4: 485-534

EWING J (1939)

A review of the classification of bone tumors. Surg Gynecol Obstet 68: 971-976

FERRARA N, DAVIS-SMYTH T (1997)

The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 18: 4-25

FERRARA N (1999)

Vascular endothelial growth factor: molekular and biological aspects. Curr Top Microbiol Immunol 237: 1-30

FEULGEN R, ROSSENBECK H (1924)

Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäuren. Z physik Chem 135: 203

FLETSCHER DM

Chondroid tumors. Diagnostic histopathology of tumors. Churchill Livingstone (2000)

FOLKMAN J, HANAHAN D (1991)

Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takamatsu Symp 22: 339-347

FOLKMAN J (1999)

Angiogenesis research: from laboratory to clinic. Forum 9: 59-62

FOLKMAN J (2002)

Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.

Semin Oncol 29: 15-18

FONTANINI G, BIGINI D, VIGNATI S, BASOLO F, MUSSI A,
CHINE S, ANGELETTI CA, HARRIS AL, BEVILACQUA G (1995)

Microvessel count predicts metastatic disease and
survival in non small cell lung cancer. J Pathol 177:
57-63

FOX SB, LEEK RD, WEEKES MP, WHITEHOUSE RM GATTER KC,
HARRIS AL (1995)

Quantitation and prognostic value of breast cancer
angiogenesis: comparison of microvessel density,
Chalkley count, and computer image analysis. J Pathol
177: 275-283

FRANK RE, SACLARIDES TJ, LEURGANS S, SPEZIALE NJ,
DRAB EA, RUBIN DB (1995)

Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and
survival in patients with node-negative colon cancer.
Ann Surg 222: 695-699

FREYSCHMIDT J, OSTERTAG H

Knochentumore: Klinik, Radiologie, Pathologie.
Springer Verlag (1998)

GIL M, ROSZKOWSKI K (1993)

Angiogenesis in the neoplastic process. Pneumonol
Alergol Pol 61: 5-10

GIORNO R (1984)

A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. Diagn Immunol 2: 161-166

GRAHAM CH, RIVERS J, KERBEL RS, STANKIEWICZ KS, WHITE WL (1994)

Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin malignant melanomas. Am J Pathol 145: 510-514

GUESDON JL (1979)

The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 27: 1131-1139

HANAHAN D, FOLKMAN J (1996)

Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353-364

HELIO H, KARAHARJU E, BOHLING T, KIVIOJA A, NORDLING S (1995)

Chondrosarcoma of bone. A clinical and DNA flow cytometric study. Eur J Surg Oncol 21: 408-413

HOLLINGSWORTH HC, KOHN EC, STEINBERG SM, ROTHENBERG ML, MERINO MJ (1995)

Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol 147: 33-41

HOLZER G, OBERMAIR A, KOSCHAT M, PREYER O, KOTZ R, TRIEB K (2001)

Concentration of VEGF in the serum of patients with malignant bone tumors. Med Pediatr Oncol 36: 601-604

KAINZ C, SPEISER P, WANNER C, OBERMAIR A, TEMPFER C, SLIUTZ G, REINTHALLER A, BREITENECKER G (1995)

Prognostic value of tumor microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. Anticancer Res 15: 1549-1551

KLÜMPER A (1977)

Bedeutung der intraossären Angiographie für primäre maligne Knochentumoren. RöFo Fortschr Röntgenstr 127: 38-41

Kolodny A (1927)

Bone sarcoma. The primary malignant tumors of bone and the giant cell tumor. Surg Gynecol 1: 44

KOTZ R, SALZER-KUNTSCHIK M, LECHNER G, IMMENKAMP M Tumore und tumorähnliche Erkrankungen: Knochentumore. Orthophädie in Praxis und Klinik. Thieme Verlag (1984)

LEVINE HA, PAMUK S, SLEEMAN BD, NILSEN-HAMILTON M (2001)

Mathematical modeling of capillary formation and development in tumor angiogenesis: penetration into the stroma. Bull Math Biol 63: 801-863

LICHTENSTEIN L

Bone tumors. Kimpson, London (1965)

LICHTENSTEIN L (1951)

Classification of primary tumors of bone. Cancer 4:
335-341

MAEDA K, CHUNG YS, TAKATSUKA S, OGAWA Y, SAWADA T,
YAMASHITA Y, ONODA N, KATO Y, NITTA A, ARIMOTO Y
(1995)

Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in
gastric carcinoma. J Clin Oncol 13: 477-481

MC GOUGH RL, ASWAD BI, TEREK RM (2002)

Pathologic neovascularization in cartilage tumors.
Clin Orthop 397: 76-82

MC GOUGH RL, LIN C, MEITNER P, ASWAD BI, TEREK RM
(2002)

Angiogenic cytokines in cartilage tumors. Clin Orthop
397: 62-69

MURPHEY MD, FLEMMING DJ, BOYEA SR, BOJESCUL JA, SWEET
DE, TEMPLE HT (1998)

Enchondroma versus chondrosarcoma in the appendicular
skeleton: differentiating features. Radiographics 18:
1213-1237

OBERMAIR A, CZERWENKA K, KURZ C, KAIDER A, SEVELDA P
(1994)

Tumorale Gefäßdichte bei Mammatumoren und ihr
Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Chirurg 65:
611-615

O`REILLY MS, HOLMGREN L, SHING Y, CHEN C, ROSENTHAL
RA, MOSES M, LANE SW, CAO J, SAGE EH, FOLKMAN J
(1994)

Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that
mediates the suppression of metastases by a Lewis
lung carcinoma. Cell 79: 315-328

O`REILLY MS, Boehm T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G,
LANE SW, FLYNN E, BIRKHEAD JR, OLSEN BR, FOLKMAN J
(1997)

Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis
and tumor growth. Cell 88: 277-285

REMMLE W

Skelettsystem: solitäres Chondrom, multiple
Chondrome, klassisches Chondrosarkom, dedifferen-
ziertes Chondrosarkom. Pathologie 5. Springer Verlag
(1997)

RIEDE UK, SCHÄFER HE

Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme Verlag
(2001)

RUSCHENBURG I, MISSELWITZ W, KORABIEWSKA M, DROESE M
(1998)

Comparison of the DNA content in low and high grade
NHL. Anticancer Research 18: 1617-1620

SACLARIDES TJ, SPEZIALE NJ, DRAB E, SZELUGA DJ, RUBIN
DB (1994)

Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon
Rectum 37: 921-926

SCHAJOWICZ F, ACKERMANN LU, SISSONS HA (1972)

Histological typing of bone tumors. International
histological classification of bone tumors. WHO

SCHAJOWICZ F

Tumors and tumor-like lesions of bone and joints.
Springer Verlag (1981)

SCHIEBLER TH, PEIPER U, SCHNEIDER F

Histologie. Mikroskopische Technik und Färbungen.
Springer Verlag (2001)

SCHUMPELICK V, BLEESE NM, MOMMSEN U

Knochentumore. Lehrbuch der Chirurgie. Thieme Verlag
(2000)

SHIH CS, WANG LS, YANG SS, FAHN HJ, WU LH, CHEN WY, HUANG MH (1996)

DNA flow cytometric analysis of chest-wall chondroma and chondrosarcoma. Scand J Thorac Cardiovasc Surg 30: 157-161

SHING Y, FOLKMAN J, SULLIVAN R, BUTTERFIELD C, MURRAY J, KLAGSBRUN M (1984)

Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223: 1296-1299

TOI M, HOSHINA S, YAMAMOTO Y, ISHII T, HAYASHI K, TOMINAGA T (1994)

Tumor angiogenesis in breast cancer: significance of vessel density as a prognostic indicator. Gan To Kagaku Ryoho 21: 178-182

TRUE LD

Detection systems. Atlas of diagnostic immunohistopathology. Lippincott Williams and Wilkins (1990)

VERMEULEN PB, GASPARINI G, FOX SB, TOI M, MARTIN L, MC CULLOCH P, PEZZELLA F, VIALE G, WEIDNER N, HARRIS AL, DIRIX LY (1996)

Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer 32: 2474-2484

WILLIAMS JK, CARLSON GW, COHEN C, DEROSE PB, HUNTER S, JURKIEWICZ MJ (1994)

Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. Am J Surg 168: 373-380

YUAN A, YANG PC, YU CJ, LEE YC, YAO YT, CHEN CL, LEE LN, KUO SH, LUH KT (1995)

Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in non small cell lung cancer.

Am J Respir Crit Care Med 152: 2157-2162

YAMAZAKI K, ABE S, TAKEKAWA H, SUKOH N, WATANABE N, OGURA S, NAKAIJIMA I, ISOBE H, INOUE K, KAWAKAMI Y (1994)

Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. Cancer 74: 2245-2250

9. LEBENS LAUF

Barbara Anna-Maria Peschka

Talstraße 7

65191 Wiesbaden

Geburtsdatum/-ort 04.07.1971 in Darmstadt

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Konfession röm.-katholisch

Schulbildung

8/77 bis 6/81 Grundschule in Giessen-Kleinlinden
7/81 bis 6/87 Gymnasialer Zweig; Brüder-Grimm-Schule
Giessen

7/87 bis 6/90 Gymnasiale Oberstufe; Liebigschule
Giessen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
am 12.06.90

8/90 bis 8/91 Pflegepraktikum St. Josefs Krankenhaus
Giessen

9/91 bis 3/92 Freiwilliges soziales Jahr
(Arbeiterwohlfahrt Giessen)

Hochschulbildung

4/92 bis 4/97 Studium der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Giessen
3/94 Ärztliche Vorprüfung
3/95 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
3/97 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
4/98 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

4/97 bis 4/98

ZKH Bremen Nord, akademisches
Lehrkrankenhaus der Universität
Göttingen, mit den
Fächern: Chirurgie
Innere Medizin
Anästhesie+Intensivmedizin

Arzt im Praktikum

6/98 bis 11/99

ZKH Bremen Nord, Abt. für Allgemein-,
Viszeral- und Gefäßchirurgie

Assistenzarzt

12/99 bis 9/02

ZKH Bremen Nord, Abt. für Allgemein-,
Viszeral- und Gefäßchirurgie.

ab 10/02

St.Josefs-Hospital Wiesbaden, Abt. für
Allgemein- und Unfallchirurgie

Wiesbaden den 24.06.2003

10. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. A. Schulz und Herrn PD Dr. med. Th. Dreyer danke ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und für die Erlaubnis der Einsichtnahme der Krankenakten sowie der histologischen Präparate des Instituts für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für die Unterstützung und Betreuung danke ich Herrn PD Dr. med. Th. Dreyer und Herrn Dr. med. Heinrichs.

Außerdem danke ich Herrn Papst (Institut für Medizinische Informatik, Justus-Liebig-Universität Gießen) und Herrn Wosniok (Institut für Mathematik/Informatik, Universität Bremen) für die Beratung in statistischen Fragestellungen.